

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004832

International filing date: 17 March 2005 (17.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-081688
Filing date: 19 March 2004 (19.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 1 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 1 6 8 8

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 8 1 6 8 8
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): ジェノミディア株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	J104788047
【提出日】	平成16年 3月19日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C07K 5/00 C07K 5/04 A61P 9/10
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市小野原5-4 フォルク北千里B棟104
【氏名】	西川 智之
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府茨木市北春日丘4-1 1-40 パークヒル尾崎301号
【氏名】	中神 啓徳
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市小野原東6-1 2-8
【氏名】	金田 安史
【特許出願人】	
【識別番号】	302060281
【氏名又は名称】	ジェノミディア株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100078282
【弁理士】	
【氏名又は名称】	山本 秀策
【選任した代理人】	
【識別番号】	100062409
【弁理士】	
【氏名又は名称】	安村 高明
【選任した代理人】	
【識別番号】	100113413
【弁理士】	
【氏名又は名称】	森下 夏樹
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	001878
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

以下：

（a）配列番号 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を含む、ポリヌクレオチド；

（b）配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする配列を含む、ポリヌクレオチド、

（c）配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド、；

（d）（a）～（c）のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；および

（e）（a）～（c）のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70 % である塩基配列からなるポリヌクレオチド、からなる群から選択されるポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fos プロモーターからの転写促進活性、VEGF プロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有するペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 1 に記載の塩基配列を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

血管新生活性を有するペプチドをコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

血管内皮細胞増殖活性を有するペプチドをコードする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

【請求項 9】

組織の血管新生を生じさせる方法であって、以下；

（1）血管新生を生じさせる組織を提供する工程；および

（2）該血管内皮細胞に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。

【請求項 10】

前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。

【請求項 13】

前記血管内皮細胞の増殖は、インピボ、エキソピボまたはインビトロで行われる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、プラスミド。

【請求項 16】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子導入ベクター。

【請求項 17】

血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に請求項 16 に記載の遺伝子導入ベクターを接触させる工程、を包含する、方法。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。

【請求項 19】

以下：

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列またはそのフラグメントによってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む、ポリペプチド、

(c) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有する改変体ポリペプチド；および

(d) (a) ~ (c) のいずれか 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチドであって、ここで、前記ポリペプチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fos プロモーターからの転写促進活性、VEGF プロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有する、ポリペプチド。

【請求項 20】

配列番号 1 に記載の塩基配列によってコードされる、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

血管新生活性を有する、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

血管内皮細胞増殖活性を有する、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

請求項 19 に記載のポリペプチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

【請求項 25】

請求項 19 に記載のポリペプチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

【請求項 26】

請求項 19 に記載のポリペプチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バー

ジャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

【請求項 27】

組織の血管新生を生じる方法であって、以下；

- (1) 血管新生する組織を提供する工程；および
 - (2) 該血管内皮細胞に請求項 19 に記載のポリペプチドを接触させる工程、
- を包含する、方法。

【請求項 28】

前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

- (1) 血管内皮細胞を提供する工程；および
 - (2) 該血管内皮細胞に請求項 18 に記載のポリペプチドを接触させる工程、
- を包含する、方法。

【請求項 31】

前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、請求項 30 に記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管内皮増殖促進遺伝子

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および／または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

血管新生を促進することによって、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、ならびに、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性心疾患・脳疾患を処置し得る（非特許文献1-7）。

【0003】

血管新生を促進するタンパク質としては、HGF（肝細胞増殖因子）、VEGF（血管内皮細胞増殖因子）（特許文献1および2）が公知である。しかし、その血管新生活性は、疾患の治療に用いるには十分とはいえない。タンパク質の場合、分子量が大きいため、精製が困難であり、その細胞への取り込みも、ベクターを用いなければ低いという欠点を有する。VEGFでは、血管平滑筋の遊走がおこらず、新生血管が脆弱で浮腫が起こりやすい。HGFは、遊走能が高いが、逆に高発現した場合、癌があれば転移を誘発する危険性もあるなどの欠点を有するため、疾患の治療に用いるには適切とはいえない。そこで、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、ならびに、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性心疾患・脳疾患の処置のための、新規ポリペプチドが求められている。

【特許文献1】 特表平10-510718

【特許文献2】 特表2001-517075

【非特許文献1】 血管新生療法－基礎と臨床－、内田康美・小塚裕編、真興交易株式会社 医書出版部、1997年5月25日

【非特許文献2】 The FASEB J. 17 779-781, 2003

【非特許文献3】 Circulation 97, 1114-1123, 1998

【非特許文献4】 The Lancet, 348, 370-374, 1996

【非特許文献5】 Circulation 105, 1491-96, 2002

【非特許文献6】 Gene Therapy 7, 417-427, 2000

【非特許文献7】 Circulation 109, 424-431, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および／または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明は、これらポリペプチドおよび／またはポリペプチドを含む、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物、ならびにこれら疾患の処置方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、血管内皮増殖促進因子は血管新生を促す可能性が高いという知見に基づき、新規のスクリーニング方法を用いることによって、新規のペプチドをコードする核酸を単離することによって完成された。

【0006】

したがって、本発明は、以下を提供する。

1. 以下：

(a) 配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を含む、ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする配列を含む、ポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド、；

(d) (a)～(c)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；および

(e) (a)～(c)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなるポリヌクレオチド、からなる群から選択されるポリヌクレオチドであって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有するペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

2. 配列番号1に記載の塩基配列を有する、項目1に記載のポリヌクレオチド。

3. 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

4. 血管新生活性を有するペプチドをコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

5. 血管内皮細胞増殖活性を有するペプチドをコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

6. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

7. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

8. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

9. 組織の血管新生を生じさせる方法であって、以下；

(1) 血管新生を生じさせる組織を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。

10. 前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目9に記載の方法。

11. 前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、項目9に記載の方法。

12. 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目1に記載のポリヌクレオチドを含む核酸を導入する工程、を包含する、方法。

13. 前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目12に記載の方法。

14. 前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、項目12に記載の方法。

15. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、プラスミド。

16. 項目1に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子導入ベクター。

17. 血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

(1) 血管内皮細胞を提供する工程；および

(2) 該血管内皮細胞に項目16に記載の遺伝子導入ベクターを接触させる工程、

を包含する、方法。

18．項目1に記載のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。

19．以下：

（a）配列番号1に記載の塩基配列またはそのフラグメントによってコードされるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

（b）配列番号2に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む、ポリペプチド、

（c）配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチド；および

（d）（a）～（c）のいずれか1つのポリペプチドのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも70％であるアミノ酸配列からなる、ポリペプチド、
からなる群から選択されるポリペプチドであって、ここで、前記ポリペプチドは、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性を有する、ポリペプチド。

20．配列番号1に記載の塩基配列によってコードされる、項目19に記載のポリペプチド。

21．配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、項目19に記載のポリペプチド。

22．血管新生活性を有する、項目19に記載のポリペプチド。

23．血管内皮細胞増殖活性を有する、項目19に記載のポリペプチド。

24．項目19に記載のポリペプチドを含有する、血管新生のための薬学的組成物。

25．項目19に記載のポリペプチドを含有する、血管内皮細胞増殖のための薬学的組成物。

26．項目19に記載のポリペプチドを含有する、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物。

27．組織の血管新生を生じる方法であって、以下；

（1）血管新生する組織を提供する工程；および

（2）該血管内皮細胞に項目19に記載のポリペプチドを接触させる工程、
を包含する、方法。

28．前記血管新生は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目27に記載の方法。

29．前記組織は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む状態にある、項目27に記載の方法。

30．血管内皮細胞を増殖させる方法であって、以下；

（1）血管内皮細胞を提供する工程；および

（2）該血管内皮細胞に項目18に記載のポリペプチドを接触させる工程、
を包含する、方法。

31．前記血管内皮細胞の増殖は、インビボ、エキソビボまたはインビトロで行われる、項目30に記載の方法。

32．前記血管内皮細胞は、閉塞性動脈疾患、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患を含む組織中にある、項目30に記載の方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明によって、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性の少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供

される。

【0008】

さらに、本発明によって、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置方法、ならびに処置のための薬学的組成物もまた、提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0010】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0011】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。本発明の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとる。このようなポリペプチド形態の本発明の遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

【0012】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'-ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）

ne)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-デオキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体(例えば、縮重コドン置換体)および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された(または、すべての)コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る(Batzerら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。本発明の遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。このようなポリヌクレオチド形態の本発明の遺伝子または遺伝子産物は、本発明の診断、予防、治療または予後のための組成物として有用である。

【0013】

本明細書では「核酸分子」もまた、核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体(改変体)」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる(別の)核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物(組換え形態のスプライス産物を含む)がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、本発明の遺伝子には、そのスプライス変異体もまた包含され得る。

【0014】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子(たとえば、プロモーター)という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、遺伝子というときは、通常、本発明の遺伝子の構造遺伝子ならびにそのプロモーターなどの転写および/または翻訳の調節配列の両方を包含する。本発明では、構造遺伝子のほか、転写および/または翻訳などの調節配列もまた、神経再生、神経疾患の診断、治療、予防、予後などに有用であることが理解される。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに/または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」ならびに/または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

【0015】

本明細書において遺伝子(例えば、核酸配列、アミノ酸配列など)の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。また、本明細書において配列(核酸配列、アミノ酸配列など)の同一性とは、2以上の対比可能な配列の、互いに対する同一の配列(個々の核酸、アミノ酸など)の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下での

ハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて相同性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、相同性と類似性とは同じ数値を示す。

【0016】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用い、デフォルトパラメータを用いて算出される。

【0017】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、γ-カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

【0018】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

【0019】

本明細書において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、アンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

【0020】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログであり得る。したがって、マウスの遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物（ヒト、ラット、ブタ、ウ

シなど)においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子の配列をクエリ配列として用いてその動物(例えばヒト、ラット)の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

【0021】

本明細書中で使用される「異種」とは、異なる配列または対応しない配列、あるいは異なる種由来の配列である、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をいう。例えば、マウスのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、ヒトのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種であり、そしてヒトの核酸配列またはアミノ酸配列は、ヒトアルブミンのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して異種である。

【0022】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-0-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

【0023】

本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド(長さがn)に対して、1~n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、この具体的に列挙していない整数で表される長さ(例えば、11など)もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または下限としての上述の個数は、その個数の上下数個(または例えば上下10%)のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本明細書において有用なフラグメントの長さは、そのフラグメントの基準となる全長タンパク質の機能のうち少なくとも1つの機能が保持されているかどうかによって決定され得る。

【0024】

本明細書において第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」とは、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して、第二の物質または因子以外の物質または因子(特に、第二の物質または因子を含むサンプル中に存在する他の物質または因子)に対するよりも高い親和性で相互作用することをいう。物質または因子について特異的な相互作用としては、例えば、核酸におけるハイブリダイゼーション、タンパク質における抗原抗体反応、リガンド-レセプター反応、酵素-基質反応など、核酸およびタンパク質の両方が関係する場合、転写因子とその転写因子の結合部位との反応など、タンパク質-脂質相互作用、核酸-脂質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。従って、物質または因子がともに核酸である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、第一の物質または因子が、第二の物質または因子に対して少なくとも一部に相補性を有することが包含される。また

例えば、物質または因子がともにタンパク質である場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」こととしては、例えば、抗原抗体反応による相互作用、レセプターーリガンド反応による相互作用、酵素ー基質相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。２種類の物質または因子がタンパク質および核酸を含む場合、第一の物質または因子が第二の物質または因子に「特異的に相互作用する」ことには、転写因子と、その転写因子が対象とする核酸分子の結合領域との間の相互作用が包含される。したがって、本明細書においてポリヌクレオチドまたはポリペプチドなどの生物学的因子に対して「特異的に相互作用する因子」とは、そのポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドなどの生物学的因子に対する親和性が、他の無関連の（特に、同一性が３０％未満の）ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに対する親和性よりも、代表的には同等またはより高いか、好ましくは有意に（例えば、統計学的に有意に）高いものを包含する。そのような親和性は、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、結合アッセイなどによって測定することができる。本明細書において「因子」（agent）としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を（例えば、７０％以上の配列同一性）もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物（例えば、単鎖抗体）、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

【００２５】

本明細書中で使用される「化合物」は、任意の識別可能な化学物質または分子を意味し、これらには、低分子、ペプチド、タンパク質、糖、ヌクレオチド、または核酸が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこのような化合物は、天然物または合成物であり得る。

【００２６】

本明細書において「有機低分子」とは、有機分子であって、比較的分子量が小さなものをいう。通常有機低分子は、分子量が約１０００以下のものをいうが、それ以上のものであってもよい。有機低分子は、通常当該分野において公知の方法を用いるかそれらを組み合わせることで合成することができる。そのような有機低分子は、生物に生産させてもよい。有機低分子としては、例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

【００２７】

本明細書中で使用される「接触（させる）」とは、化合物を、直接的または間接的のいずれかで、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して物理的に近接させることを意味する。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多くの緩衝液、塩、溶液などに存在し得る。接触とは、核酸分子またはそのフラグメントをコードするポリペプチドを含む、例えば、ピーカー、マイクロタイタープレート、細胞培養フラスコまたはマイクロアレイ（例えば、遺伝子チップ）などに化合物を置くことが挙げられる。

【００２８】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF (a b ')₂およびF a b断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、αガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

【0029】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにF a b分子、F (a b ')₂フラグメント、F vフラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

【0030】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、K o h l e rおよびM i l s t e i n, N a t u r e (1 9 7 5) 2 5 6 : 4 9 5）またはその改変（例えば、B u c kら(1 9 8 2) I n V i t r o 1 8 : 3 7 7）を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するB細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

【0031】

本明細書において「抗原」(a n t i g e n) とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(i m m u n o g e n) とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

【0032】

本明細書において「単鎖抗体」とは、F v領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されれることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じたものをいう。

【0033】

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖、低分子などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、配列番号2のアミノ酸を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントであって、血管内皮細胞増殖活性、c - f o s プロモーターからの転写促進活性、V E G F プロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性の少なくとも1つの活性を有する限り、それぞれの改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸分子も使用することができる。また、そのような核酸分子を含む複合分子も使用することができる。

【0034】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸

およびタンパク質を包含する。

【0035】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

【0036】

本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。

【0037】

本明細書において「純化（された）」および「クローニング（された）」とは、互換可能に用いられる。「純化（された）」および「クローニング（された）」とは、ある物質または核酸の状態についていい、その核酸の存在頻度を高い状態にすることであって、好ましくは、その物質または核酸が、他の種類の物質または核酸が実質的に伴わない状態をいう。本明細書において「純化」および「クローニング」に関する文脈において使用される場合、他の種類の物質または核酸が「実質的に伴わない状態」とは、それら他の種類の物質または核酸が全く存在しない状態か、または存在するとしても、目的の物質または核酸に対して、何ら影響を与えない状態をいう。従って、より好ましい状態では、純化された核酸または核酸組成物は、ある特定の核酸のみを含む。

【0038】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入」とは、生体内またはインビトロにおいて、標的細胞内に、天然、合成または組換えの所望の遺伝子または遺伝子断片を、導入された遺伝子とその機能を維持するように、導入することをいう。本発明において導入される遺伝子または遺伝子断片は、特定の配列を有するDNA、RNAまたはこれらの合成アナログである核酸を包含する。また、本明細書において使用される場合、遺伝子導入、トランスフェクション、およびトランスフェクトは、互換可能に使用される。

【0039】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」は互換可能に使用される。「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。「遺伝子導入ベクター」および「遺伝子ベクター」としては、「ウイルスエンベロープベクター」および「リボソームベクター」が挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

本明細書で使用される場合、「ウイルスエンベロープベクター」とは、ウイルスエンベロープ中に外来遺伝子を封入したベクター、またはウイルスエンベロープ由来のタンパク質を含む成分中に外来遺伝子を封入したベクターをいう。遺伝子導入ベクターの調製のために使用されるウイルスとしては、野生型ウイルスであっても、組換え型ウイルスであってもよい。

【0041】

本発明において、ウイルスエンベロープまたはウイルスエンベロープ由来タンパク質の調製のために使用されるウイルスとしては、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、パラミクソウイルス科に属するウイルスが、より好ましくは、HVJ（センダイウイルス）が、用いられる。

【0042】

ウイルスエンベロープ由来タンパク質としては、例えば、HVJのFタンパク質、HN

タンパク質、NPタンパク質およびMタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

本明細書で使用される場合、「リボソームベクター」とは、リボソーム中に外来遺伝子を封入したベクターをいう。リボソームベクターの調製のために使用される脂質としては、例えば、DOPE（ジオレオイルホスファチジルエタノラミン）およびホスファチジルコリンなどの中性リン脂質、コレステロール、ホスファチジルセリンおよびホスファチジン酸などの負電荷リン脂質、ならびにDC-コレステロール（ジメチルアミノエタンカルバモイルコレステロール）およびDOTAP（ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン）などの正電荷脂質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

本明細書で使用される場合、「リボソーム」とは、脂質二重膜の一種である。例えば、レシチンのようなリン脂質を50%（重量比）以上の水に、そのリン脂質固有のゲル-液晶相転移温度以上で懸濁すると脂質二重層からなる、内部に水相を有する閉鎖小胞が形成される。この小胞をリボソームという。二分子膜が何枚もタマネギ状に重なった多重膜リボソーム（MLV）と、膜が1枚のリボソームに大別される。後者はまた、ホスファチジルコリンのようなリン脂質のサスペンション（懸濁液）を、ミキサーで激しく攪拌して分散した後、超音波処理を行なうことによって調製することが可能である。

【0045】

膜が1枚のリボソームはさらに、その粒子径によって小さな単膜リボソーム（SUV）と大きな単膜リボソーム（LUV）とに分類される。MLVは、脂質薄膜に水を加えて機械的振動を与えることにより調製される。SUVは、MLVを超音波するか、または脂質と界面活性剤の混合溶液から界面活性剤を透析などで除去するなどによって調製される。また、これ以外にも、（1）SUVの凍結融解を繰り返して、LUVを調製する方法、（2）酸性リン脂質でできたSUVを Ca^{2+} の存在下で融合させ、そしてこの Ca^{2+} をEDTA（エチレンジアミン四酢酸）で除去することにより調製する方法、（3）脂質のエーテル溶液と水のエマルジョンからエーテルを留去しながら、相の転換を行ってLUVなどを調製する方法（逆相蒸発法リボソーム；REV）が周知である。

【0046】

本明細書において使用する場合、「界面活性剤」と「表面活性剤」とは、互換可能に使用される。界面活性剤とは、水に対して強い表面活性を示し、溶液内において臨界ミセル濃度以上でミセルのような会合体を形成する物質をいう。界面活性剤は、分子内に親水性の部分と疎水性（親油性）の部分とをあわせもち、その親水親油バランスによって、水-油の2相界面に強く吸着されて、界面の自由エネルギー（界面張力）をいちじるしく低下させる作用を示す。疎水基は代表的にはアルキル基などの長鎖炭化水素基であるが、親水基にはイオン性解離基や、ヒドロキシ基などの非イオン性極性基があり得る。カルボキシ基、スルホ基、硫酸水素基-OSO₃Hを持つものは、水中で解離して陰イオンとなるので、陰イオン界面活性剤(anionicsurfactant)とよばれる。代表的には、脂肪酸せっけん、アルキルベンゼンスルホン酸塩などが挙げられるがこれらに限定されない。これに対し第4級アンモニウム基をもつものは解離して陽イオンとなるので、陽イオン界面活性剤(cationicsurfactant)とよばれる。長鎖アルキルアミノ酸のように、同一分子中に陽イオン性と陰イオン性の解離基をあわせもつものもあり、両性界面活性剤(amphoteric surfactant)とよばれる。また非イオン性の極性基をもつものは非イオン界面活性剤(nonionic surfactant)とよばれ、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルなどが代表的である。

【0047】

本明細書において使用する場合、「脂質」とは、（1）分子中に長鎖脂肪酸または類似の炭化水素鎖を持ち、かつ（2）生体内に存在するか、または生体に由来する分子である限り、任意の脂質が含まれる。好ましい脂質は、リボソームを形成し得るリン脂質であり、より好ましい脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、コレステロール、スフィンゴミ

エリン、およびホスファチジン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

本明細書において使用する場合、「脂肪酸」とは、天然の脂質の加水分解によって得られる脂肪族モノカルボン酸および脂肪族ジカルボン酸をいう。代表的な脂肪酸としては、アラキドン酸、パルミチン酸、オレイン酸およびステアリン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入活性」とは、ベクターによる「遺伝子導入」の活性をいい、導入された遺伝子の機能（例えば、発現ベクターの場合、コードされるタンパク質の発現および／またはそのタンパク質の活性など）を指標として検出され得る。

【0050】

本明細書で使用される場合、「不活性化」とは、ゲノムを不活性化したウイルスをいう。この不活性化ウイルスは、複製欠損である。好ましくは、この不活性化は、UV処理またはアルキル化剤による処理によって、なされる。

【0051】

本明細書で使用される場合、「外来遺伝子」とは、ウイルスエンベロープベクター内に含まれるウイルス以外の起源の核酸、またはリポソームベクター内に含まれる核酸をいう。本発明の1つの局面において、この外来遺伝子は、遺伝子導入ベクターによって導入された遺伝子が発現するために適切な調節配列（例えば、転写に必要なプロモーター、エンハンサー、ターミネーター、およびポリA付加シグナル、ならびに翻訳に必要なリボゾーム結合部位、開始コドン、終止コドンなど）と作動可能に連結される。本発明の別の局面において、外来遺伝子は、この外来遺伝子の発現のための調節配列を含まない。本発明のさらなる局面において、外来遺伝子は、オリゴヌクレオチドまたはデコイ核酸である。

【0052】

遺伝子導入ベクター内に含まれる外来遺伝子は、代表的にはDNAまたはRNAの核酸分子であるが、導入される核酸分子は、核酸アナログ分子を含んでもよい。遺伝子導入ベクター内に含まれる分子種は、単一の遺伝子分子種であっても、複数の異なる遺伝子分子種であってもよい。

【0053】

本明細書で使用される場合、「遺伝子ライブラリー」とは、天然より単離された核酸配列または合成の核酸配列を含む、核酸ライブラリーである。天然より単離された核酸配列の供給源としては、真核生物細胞、原核生物細胞、またはウイルス由来の、ゲノム配列、cDNA配列が挙げられるが、これらに限定されない。天然より単離された配列に、任意の配列（例えば、シグナル、タグなど）を付加したライブラリーもまた、本発明の遺伝子ライブラリーに含まれる。1つの実施態様において、遺伝子ライブラリーは、その中に含まれる核酸配列の、転写および／または翻訳をもたらすプロモーターなどの配列を含む。

【0054】

本明細書において、「HVJ」および「セグダイウイルス」は、互換可能に用いられ得る。例えば、本明細書において「HVJのエンベロープ」と「セグダイウイルスのエンベロープ」とは同一の意味を示す語句として用いられる。

【0055】

本明細書において「セグダイウイルス」とは、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス属に属し、細胞融合作用をもつウイルスをいう。ウイルス粒子は、エンベロープをもち、直径150～300nmの多形性を示す。ゲノムは、約15500塩基長のマイナス鎖RNAである。RNAポリメラーゼを持ち、熱に不安定で、ほとんどあらゆる種類の赤血球を凝集し、また溶血性を示す。

【0056】

本明細書において、「HAU」とは、ニワトリ赤血球0.5%を凝集可能なウイルスの活性をいい、1 HAUは、ほぼ2400万ウイルス粒子に相当する（Okada, Y., Biken Journal 4, 209～213, 1961）。

【0057】

本発明で用いられる「候補核酸」は、純化を目的とする核酸であれば、どのようなものであってもよい。本発明において、候補核酸の集団は、哺乳動物細胞などの第1の宿主細胞を用いて、細胞内に含まれる形態で、または細胞から単離された形態で得られる。そのようにして得られた候補核酸の集団は、第2の宿主細胞を用いて、純化される。

【0058】

宿主細胞として使用される動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト大腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15などが例示される。

【0059】

本明細書において「動物」は、当該分野において最も広義で用いられ、脊椎動物および無脊椎動物を含む。動物としては、哺乳綱、鳥綱、爬虫綱、両生綱、魚綱、昆虫綱、蠕虫綱などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0060】

本明細書において、生物の「組織」とは、細胞の集団であって、その集団において一定の同様の作用を有するものをいう。従って、組織は、臓器（器官）の一部であり得る。臓器（器官）内では、同じ働きを有する細胞を有することが多いが、微妙に異なる働きを有するものが混在することもあることから、本明細書において組織は、一定の特性を共有する限り、種々の細胞を混在して有していてもよい。

【0061】

第2の宿主細胞としては、候補核酸を「遺伝子導入」することができる細胞であれば特に限定されず、従来から遺伝子操作において利用される各種の宿主細胞（例えば、原核細胞、真菌細胞など）を用いることができる。

【0062】

原核細胞としては、Escherichia、Bacillus、Streptococcus、Staphylococcus、Haemophilus、Neisseria、Actinobacillus、Acinetobacter、Serratia、Brevibacterium、Corynebacterium、Microbacterium、およびPseudomonasからなる群から選択される属等に属する原核細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No. 49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21 (DE3)、Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS、Escherichia coli HMS174 (DE3)、Escherichia coli HMS174 (DE3) pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutam

i cum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110などが例示される。

【0063】

真菌細胞としては、Saccharomyces、Schizosaccharomyces、Kluyveromyces、Trichosporon、Schwanniomycetes、Pichiaなどに属する酵母菌株、ならびにNeurosporaに属する真菌を挙げることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomycetes alluvius、Pichia pastorisなどを挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、真菌にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法【Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)】、スフェロプラスト法【Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)】、酢酸リチウム法【J. Bacteriol., 153, 163 (1983)】、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法などが例示される。

【0064】

植物細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、ニンジン、コムギ、オオムギ、ライムギ、アルファルファ、アマなどの植物細胞などを挙げることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、Agrobacterium法（特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（特許第2606856、特許第2517813）などが例示される。

【0065】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巢細胞、Trichoplusia niの卵巢細胞、カイコ卵巢由来の培養細胞などを用いることができる。Spodoptera frugiperdaの卵巢細胞としてはSf9、Sf21（Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual）など、Trichoplusia niの卵巢細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（Invitrogen）など、カイコ卵巢由来の培養細胞としてはBombyx mori N4などが例示される。

【0066】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインピボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

【0067】

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。

。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。このような遺伝子または遺伝子産物（ポリペプチドまたはポリヌクレオチド）の発現の増加または減少は、本発明の治療形態、予後形態または予防形態において有用であり得る。

【0068】

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、動物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。

【0069】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、配列番号1に記載のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの場合、そのペプチドに特異的な抗体との結合活性、血管内皮細胞増殖活性、血管内皮細胞遊走活性、管腔形成活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、ETSプロモーターからの転写促進活性、および血管新生活性からなる群から選択される活性をいう。2つの因子が相互作用する場合、その生物学的活性は、その二分子との間の結合およびそれによって生じる生物学的変化、例えば、一つの分子を抗体を用いて沈降させたときに他の分子も共沈するとき、2分子は結合していると考えられる。したがって、そのような共沈を見ることが一つの判断手法として挙げられる。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

【0070】

したがって、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、または例えば、いくつかの刺激後または事象後の上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度が、挙げられる。

【0071】

本明細書において「相互作用」とは、2つの物質についていうとき、一方の物質と他方の物質との間で力（例えば、分子間力（ファンデルワールス力）、水素結合、疎水性相互作用など）を及ぼしあうこという。通常、相互作用をした2つの物質は、会合または結合している状態にある。

【0072】

本明細書中で使用される用語「結合」は、2つのタンパク質もしくは化合物または関連するタンパク質もしくは化合物の間、あるいはそれらの組み合わせの間での、物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合には、イオン結合、非イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用などが含まれる。物理的相互作用（結合）は、直接的または間接的であり得、間接的なものは、別のタンパク質または化合物の効果を介するかまたは起因する。直接的な結合とは、別のタンパク質または化合物の効果を介してもまたはそれらに起因しても起こらず、他の実質的な化学中間体を伴わない、相互作用をいう。

【0073】

本明細書中で使用される用語「調節する（modulate）」または「改変する（m

o d i f y) 」は、特定の活性、因子またはタンパク質の量、質または効果における増加または減少あるいは維持を意味する。

【0074】

本明細書において「アンチセンス（活性）」とは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制または低減することができる活性をいう。アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列を有する分子を本明細書において「アンチセンス分子」、「アンチセンス核酸分子」または「アンチセンス核酸」と称し、これらは互換的に使用される。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、もっとも好ましくは95%相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の5'末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1つまたは数個あるいは1つ以上のヌクレオチドの置換、付加および／または欠失を有するものもまた含まれる。本明細書中で開示される核酸配列（例えば、配列番号1）が与えられれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrick塩基対形成の法則またはHogsteen塩基対形成の法則に従い設計され得る。アンチセンス核酸分子は、シグナル伝達因子のmRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、mRNAのコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNAの翻訳開始部位の周辺の領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、または約50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学合成または酵素的連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、またはその分子の生物学的安定性を増加させるかもしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された種々の改変ヌクレオチドを用いて（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る）化学合成され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例として、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン（queosine）、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイブトキシ（wybutoxosine）、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、および2, 6-ジアミノプリンなどが挙げられるがそれらに

限定されない。

【0075】

本明細書において「RNAi」とは、RNA interferenceの略称で、二本鎖RNA（dsRNAともいう）のようなRNAiを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNAiはまた、場合によっては、RNAiを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

【0076】

本明細書において「RNAiを引き起こす因子」とは、RNAiを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNAiを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNAiを引き起こし、RNAiがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなRNAiを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3'突出末端を含み、より好ましくは、3'突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

【0077】

理論に束縛されないが、RNAiが動く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い（例えば、40塩基対以上）RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー（Dicer）と呼ばれるRNaseIII様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3'末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA（siRNAとも呼ばれる）を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC（RNA-induced silencing complex）が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNaseIII様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA）をそのような因子として用いることができる。

【0078】

また、理論に束縛されることを希望しないが、siRNAは、上記経路とは別に、siRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRP）のプライマーとして作用し、dsRNAが合成され、このdsRNAが再びダイサーの基質となり、新たなsiRNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のdsRNA分子が、1,000コピー以上ある細胞内のmRNAをほぼ完全に分解することから、siRNA自体およびsiRNAが生じ

るような因子が有用であることが理解される。

【0079】

本発明において s i R N A と呼ばれる、約 20 塩基前後（例えば、代表的には約 21 ～ 23 塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖 R N A を用いることができる。このような s i R N A は、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、その s i R N A の標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

【0080】

本発明において用いられる s i R N A は、R N A i を引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

【0081】

別の実施形態において、本発明の R N A i を引き起こす因子は、3' 末端に突出部を有する短いヘアピン構造（s h R N A ; s h o r t h a i r p i n R N A）であり得る。本明細書において「s h R N A」とは、一本鎖 R N A で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約 20 塩基対以上の分子をいう。そのような s h R N A は、人工的に化学合成される。あるいは、そのような s h R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖の D N A 配列を逆向きに連結したヘアピン構造の D N A を T 7 R N A ポリメラーゼによりインビトロで R N A を合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのような s h R N A は、細胞内に導入された後、細胞内で約 20 塩基（代表的には例えば、21 塩基、22 塩基、23 塩基）の長さに分解され、s i R N A と同様に R N A i を引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、s h R N A は、s i R N A と同様に R N A i を引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。s h R N A はまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約 10 ヌクレオチド長以上、より好ましくは約 20 ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくは D N A であり得、より好ましくは少なくとも 2 ヌクレオチド長以上の D N A であり得、さらに好ましくは 2 ～ 4 ヌクレオチド長の D N A であり得る。

【0082】

本発明において用いられる R N A i を引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

【0083】

本発明において用いられる R N A i を引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T 7 R N A ポリメラーゼおよび T 7 プロモーターを用いて、鋳型 D N A からアンチセンスおよびセンスの R N A を合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じて R N A i が引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのような R N A を細胞内に導入することができる。

【0084】

本発明の R N A i を引き起こす因子としてはまた、m R N A とハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

【0085】

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を

用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コローニあるいはブラク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0086】

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)；およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, IV, IRL Press Limited (Oxford, England). Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件 (例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤) を、使用してもよい。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO₄ またはSDS)、Ficoll、Denhardt 溶液、超音波処理されたサケ精子DNA (または別の非相補的DNA) および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8～7.4で実施されるが；代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England) を参照のこと。

【0087】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、 $\% \text{G} + \text{C}$ は、ハイブリッド中の（グアニン＋シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致（ミスマッチ）に対して約1℃ずつ減少する。

【0088】

本明細書において「中程度にストリンジেন্টな条件」とは、「高度にストリンジেন্টな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジেন্টな条件」の例は、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジেন্টな」条件は、約21%の不一致を許容する。

【0089】

本明細書において「高度」にストリンジেন্টな条件と「中程度」にストリンジেন্টな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃である。65℃（同じイオン強度）での洗浄において、これは、約6%不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

【0090】

約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1MNaClにおける融解温度の適切な概算は、

$$T_m = (1 \text{つのA-T塩基につき } 2^{\circ}\text{C}) + (1 \text{つのG-C塩基対につき } 4^{\circ}\text{C})$$

によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである（Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox（編）（1981）を参照のこと）。

【0091】

配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号1の核酸配列の一部またはその改変体を含むPCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラリーから容易に分離される。配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mMリン酸ナトリウム（ NaPO_4 ）；1mMEDTA；42℃の温度で7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に2×SSC（600mMNaCl；60mMクエン酸ナトリウム）；50℃の0.1%SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジেন্ট条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン（BSA）；500mMリン酸ナトリウム（ NaPO_4 ）；15%ホルムアミド；1mMEDTA；7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に50℃の1×SSC（300mMNaCl；30mMクエン酸ナトリウム）；1%SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジेंट条件下、最も好ましくは本質的に50℃の温

度での1%ウシ血清アルブミン(BSA); 200mM リン酸ナトリウム(NaPO_4); 15%ホルムアミド; 1mM EDTA; 7%SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に65℃の0.5×SSC(150mM NaCl; 15mM クエン酸ナトリウム); 0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号1に示す配列の1つまたはその一部とハイブリダイズし得る。

【0092】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

【0093】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。

【0094】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))、FASTA(Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448(1988))、Smith and Waterman法(Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197(1981))、およびNeedleman and Wunsch法(Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453(1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマイクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ(マイクロアレイアッセイ)、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明において使用される配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドなどには、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

【0095】

本明細書において配列(アミノ酸または核酸など)の「同一性」、「相同性」および「類似性」のパーセンテージは、比較ウィンドウで最適な状態に整列された配列2つを比較することによって求められる。ここで、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の比較ウィンドウ内の部分には、2つの配列の最適なアライメントについての基準配列(他の配列に付加が含まれていればギャップが生じることもあるが、ここでの基準配列は付加も欠失もないものとする)と比較したときに、付加または欠失(すなわちギャップ)が含まれる場合がある。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がどちらの配列にも認められる位置の数を求めることによって、マッチ位置の数を求め、マッチ位置の数を比較ウィンドウ内

の総位置数で割り、得られた結果に100を掛けて同一性のパーセンテージを算出する。検索において使用される場合、相同性については、従来技術において周知のさまざまな配列比較アルゴリズムおよびプログラムの中から、適当なものを用いて評価する。このようなアルゴリズムおよびプログラムとしては、TBLASTN、BLASTP、FASTA、TFASTAおよびCLUSTALW (Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272) があげられるが、何らこれに限定されるものではない。特に好ましい実施形態では、従来技術において周知のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) (たとえば、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410, Altschul et al., 1993, Nature Genetics 3:266-272, Altschul et al., 1997, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402を参照のこと) を用いてタンパク質および核酸配列の相同性を評価する。特に、5つの専用BLASTプログラムを用いて以下の作業を実施することによって比較または検索が達成され得る。

【0096】

(1) BLASTPおよびBLAST3でアミノ酸のクエリー配列をタンパク質配列データベースと比較；

(2) BLASTNでヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチド配列データベースと比較；

(3) BLASTXでヌクレオチドのクエリー配列（両方の鎖）を6つの読み枠で変換した概念的翻訳産物をタンパク質配列データベースと比較；

(4) TBLASTNでタンパク質のクエリー配列を6つの読み枠（両方の鎖）すべてで変換したヌクレオチド配列データベースと比較；

(5) TBLASTXでヌクレオチドのクエリー配列を6つの読み枠で変換したものを、6つの読み枠で変換したヌクレオチド配列データベースと比較。

【0097】

BLASTプログラムは、アミノ酸のクエリー配列または核酸のクエリー配列と、好ましくはタンパク質配列データベースまたは核酸配列データベースから得られた被検配列との間で、「ハイスコアセグメント対」と呼ばれる類似のセグメントを特定することによって相同配列を同定するものである。ハイスコアセグメント対は、多くのものが従来技術において周知のスコアリングマトリックスによって同定（すなわち整列化）されると好ましい。好ましくは、スコアリングマトリックスとしてBLOSUM62マトリックス (Gonnet et al., 1992, Science 256:1443-1445, Henikoff and Henikoff, 1993, Proteins 17:49-61) を使用する。このマトリックスほど好ましいものではないが、PAMまたはPAM250マトリックスも使用できる（たとえば、Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundationを参照のこと）。BLASTプログラムは、同定されたすべてのハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価し、好ましくはユーザー固有の相同率などのユーザーが独自に定める有意性の閾値レベル

を満たすセグメントを選択する。統計的な有意性を求めるKarlinの式を用いてハイスコアセグメント対の統計的な有意性を評価すると好ましい(Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2267-2268 参照のこと)。

【0098】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNAまたはRNAなど）が用いられ得る。

【0099】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なくとも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも16の連続するヌクレオチド長の、少なくとも17の連続するヌクレオチド長の、少なくとも18の連続するヌクレオチド長の、少なくとも19の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なくとも50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少なくとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTAR）を用いて行ってもよい。

【0100】

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体(MHC)レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998 (所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法)；米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順)；およびGeysenら(1986)

M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 23:709 (所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

【0101】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。エピトープは線状であってもコンフォメーション形態であってもよい。

【0102】

(遺伝子、タンパク質分子、核酸分子などの改変)

あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

【0103】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157(1):105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン／シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

【0104】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質(例えば、酵素活性において等価なタンパク質)を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

【0105】

当該分野において、親水性指数もまた、改変設計において考慮され得る。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)

；グルタミン（＋0.2）；グリシン（0）；スレオニン（－0.4）；プロリン（－0.5±1）；アラニン（－0.5）；ヒスチジン（－0.5）；システイン（－1.0）；メチオニン（－1.3）；バリン（－1.5）；ロイシン（－1.8）；イソロイシン（－1.8）；チロシン（－2.3）；フェニルアラニン（－2.5）；およびトリプトファン（－3.4）。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

【0106】

本明細書において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、±2以内のもの同士、好ましくは±1以内のもの同士、より好ましくは±0.5以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0107】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮（truncated）改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。そのような改変体としては、基準となる核酸分子またはポリペプチドに対して、1または数個の置換、付加および／または欠失、あるいは1つ以上の置換、付加および／または欠失を含むものが挙げられるがそれらに限定されない。対立遺伝子（allele）とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ（homolog）」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性（好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性）を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ（ortholog）」とは、オルソログス遺伝子（orthologous gene）ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子および β ヘモグロビン遺伝子はパラログ（遺伝子重複で生じた遺伝子）である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種において、もとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

【0108】

本明細書において「保存的（に改変された）改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変（変異）」であ

る。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン（通常メチオニンのための唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く）が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、DNAリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法（特定部位指向突然変異法；Mark Zoller and Michael Smith, *Methods in Enzymology*, 100, 468-500 (1983)）が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。

【0109】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、短縮化、脂質化（lipidation）、ホスホリル化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

【0110】

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、pKa値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

【0111】

本発明のポリペプチドがポリマーに結合している、化学修飾されたポリペプチド組成物は、本発明の範囲に包含される。このポリマーは、水溶性であり得、水溶性環境（例えば、生理学的環境）でこのタンパク質の沈澱を防止し得る。適切な水性ポリマーは、例えば、以下からなる群より選択され得る：ポリエチレングリコール（PEG）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、または他の炭水化物に基づくポリマー、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）およびポリビニルアルコール。この選択されたポリマーは、通常は改変され、単一の反応性基（例えば、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒド）を有し、その結果、重合度は制御され得る。ポリマーは、任意の分子量であり得、そして、このポリマーは分枝状でも分枝状でなくともよく、そしてこのようなポリマーの混合物はまた、使用され得る。この化学修飾された本

発明のポリマーは、治療用途に決定付けられる場合、薬学的に受容可能なポリマーが使用するために選択される。

【0112】

このポリマーがアシル化反応によって改変される場合、このポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。あるいは、このポリマーが還元アルキル化によって改変される場合、このポリマーは単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。好ましい反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコール、プロピオンアルデヒド（このプロピオンアルデヒドは、水溶性である）または、そのモノC1～C10の、アルコキシ誘導体もしくはアリールオキシ誘導体である（例えば、米国特許第5,252,714号（これは、本明細書中で全体が参考として援用される）を参照のこと）。

【0113】

本発明のポリペプチドのペグ化（*pegylation*）は、例えば、以下の参考文献に記載されるような、当該分野で公知の、任意のペグ化反応によって実施され得る：*Focus on Growth Factors* 3,4-10（1992）；EP 0 154 316；およびEP 0 401 384（これらの各々は、本明細書中で、全体が参考として援用される）。好ましくは、このペグ化は、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本発明のポリペプチドのペグ化のための好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。本明細書中で使用される場合、「ポリエチレングリコール」は、PEGの任意の形態の包含することを意味し、ここで、このPEGは、他のタンパク質（例えば、モノ（C1～C10）アルコキシポリエチレングリコールまたはモノ（C1～C10）アリールオキシポリエチレングリコール）を誘導体するために使用される。

【0114】

本発明のポリペプチドの化学誘導体化を、生物学的に活性な物質を活性化したポリマー分子と反応させるのに使用される適切な条件下で、実施され得る。ペグ化した本発明のポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：（a）ポリペプチドが1以上のPEG基に結合するような条件下で、ポリエチレングリコール（例えば、PEGの、反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とこのポリペプチドを反応させる工程および（b）この反応生成物を得る工程。公知のパラメータおよび所望の結果に基づいて、最適な反応条件またはアシル化反応を選択することは当業者に容易である。

【0115】

ペグ化された本発明のポリペプチドは、一般に、本明細書中に記載のポリペプチドを投与することによって、緩和または調節され得る状態を処置するために使用され得るが、しかし、本明細書中で開示された、化学誘導体化された本発明のポリペプチド分子は、それらの非誘導体分子と比較して、さらなる活性、増大された生物活性もしくは減少した生物活性、または他の特徴（例えば、増大された半減期または減少した半減期）を有し得る。本発明のポリペプチド、それらのフラグメント、改変体および誘導体は、単独で、併用して、または他の薬学的組成物を組み合わせて使用され得る。これらのサイトカイン、増殖因子、抗原、抗炎症剤および／または化学療法剤は、徴候を処置するのに適切である。

【0116】

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

【0117】

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていても

よい。あるいは、5'末端および／または3'末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

【0118】

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

【0119】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わることまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

【0120】

（一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺

伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

【0121】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Gait, M. J. (1990). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991). *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0122】

（遺伝子工学）

本発明において用いられる配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドならびにそのフラグメントおよび改変体は、遺伝子工学技術を用いて生産することができる。

【0123】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチブルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチブルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、Sambrookら、前出）に記載されている。好ましいベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、エピソーム、ウイルス粒子またはウイルスおよび組み込み可能なDNAフラグメント（すなわち、相同組換えによって宿主ゲノム中に組み込み可能なフラグメント）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいウイルス粒子としては、アデノウイルス、バキュロウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルスおよびレトロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0124】

ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントが連結され得る環状二重鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、さらなるDNAセグメントは、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクター（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）は、これらが導入される宿主細胞中で自律的に複製し得る。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、これらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細

書中で、「発現ベクター」といわれる。

【0125】

従って、本明細書において「発現ベクター」または「発現プラスミド」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【0126】

本発明において用いられ得る原核細胞に対する「組み換えベクター」としては、p c D N A 3 (+)、p B l u e s c r i p t - S K (+/-)、p G E M - T、p E F - B O S、p E G F P、p H A T、p U C 1 8、p F T - D E S T TM 4 2 G A T E W A Y (I n v i t r o g e n) などが例示される。

【0127】

本発明において用いられ得る動物細胞に対する「組み換えベクター」としては、p c D N A I / A m p、p c D N A I、p C D M 8（いずれもフナコシより市販）、p A G E 1 0 7 [特開平3-229 (I n v i t r o g e n)、p A G E 1 0 3 [J. B i o c h e m. , 1 0 1, 1 3 0 7 (1 9 8 7)]、p A M o、p A M o A [J. B i o l. C h e m. , 2 6 8, 2 2 7 8 2 - 2 2 7 8 7 (1 9 9 3)]、マウス幹細胞ウイルス (M u r i n e S t e m C e l l V i r u s) (M S C V) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、p E F - B O S、p E G F P などが例示される。

【0128】

本明細書において「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に参与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

【0129】

本明細書において用いられる「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。

【0130】

プロモーターは、誘導性であっても、構成的であっても、部位特異的であっても、時期特異的であってもよい。プロモーターとしては、例えば、哺乳動物細胞、大腸菌、酵母などの宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。

【0131】

本明細書において、遺伝子の発現について用いられる場合、一般に、「部位特異性」とは、哺乳動物の部位におけるその遺伝子の発現の特異性をいう。「時期特異性」とは、哺乳動物の発達段階に応じたその遺伝子の発現の特異性をいう。そのような特異性は、適切なプロモーターを選択することによって、所望の生物に導入することができる。

【0132】

本明細書において、本発明のプロモーターの発現が「構成的」とあるとは、生物のすべての組織において、その生物の成長／増殖のいずれにあってもほぼ一定の量で発現される性質をいう。具体的には、ノーザンブロット分析したとき、例えば、任意の時点で（例えば、2点以上（例えば、5日目および15日目））の同一または対応する部位のいずれにおいても、ほぼ同程度の発現量がみられるとき、本発明の定義上、発現が構成的であるという。構成的プロモーターは、通常の生育環境にある生物の恒常性維持に役割を果たしていると考えられる。本発明のプロモーターの発現が「応答性」とあるとは、少なくとも1つの因子が生物体を与えられたとき、その発現量に変化する性質をいう。特に、発現量が

増加する性質を因子に対して「誘導性」といい、発現量が減少する性質を因子に対して「減少性」という。「減少性」の発現は、正常時において、発現が見られることを前提としているので、「構成的」な発現と重複する概念である。これらの性質は、生物の任意の部分からRNAを抽出してノーザンブロット分析で発現量を分析することまたは発現されたタンパク質をウェスタンブロットにより定量することにより決定することができる。因子に対して誘導性のプロモーターを本発明の部位特異的組換え誘導因子をコードする核酸とともに組み込んだベクターで形質転換された哺乳動物細胞または哺乳動物（特定の組織などを含む）は、そのプロモーターの誘導活性をもつ刺激因子を用いることにより、ある条件下での部位特異的組換え配列の部位特異的組換えを行うことができる。

【0133】

哺乳動物細胞での発現のための強力なプロモーターとしては、例えば、種々の天然のプロモーター（例えば、SV40の初期プロモーター、アデノウイルスのE1Aプロモーター、ヒト サイトメガロウイルス（CMV）のプロモーター、ヒト延長因子-1（EF-1）プロモーター、Drosophila 最小熱ショックタンパク質70（HSP）のプロモーター、ヒト メタロチオネイン（MT）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、ヒト ユビキチンC（UBC）プロモーター、ヒト アクチンプロモーター）、および人工のプロモーター（例えば、SR α プロモーター（SV40初期プロモーターとHTLVのLTRプロモーターの融合）、CAGプロモーター（CMV-Eエンハンサーとニワトリ アクチンプロモーターのハイブリッド）のような融合プロモーター）が周知であることから、これら周知のプロモーターまたはその改変体を用いることによって、組換え発現の発現量を容易に上昇させることができる。

【0134】

大腸菌を宿主細胞として使用する場合、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌およびファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等を挙げることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp \times 2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0135】

本明細書において「複製起点」とは、DNA複製が開始する染色体上の特定領域をいう。複製起点は、内因性起点を含むようにそのベクターを構築することによって提供され得るか、または宿主細胞の染色体複製機構により提供され得るかのいずれかであり得る。そのベクターが、宿主細胞染色体中に組み込まれる場合、後者が十分であり得る。あるいは、ウイルス複製起点を含むベクターを使用するよりも、当業者は、選択マーカーと本発明のDNAとを同時形質転換する方法によって、哺乳動物細胞を形質転換し得る。適切な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）またはチミジンキナーゼである（米国特許第4,399,216号を参照）。

【0136】

例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現することによって、組換え哺乳動物発現ベクターでは、特定の細胞型において核酸の発現を優先的に指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、発生的に調節されたプロモーター（例えば、マウスhoxプロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249,374-379）および α -フェトプロテインプロモーター（CampesおよびTilghman（1989）Genes Dev. 3,537-546））、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertrら（1987）Genes Dev. 1,268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv. Immunol. 43,235-275）、特にT細胞レセプター（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J. 8,729-733）および免疫グロブリン（

Banerjiら(1983) Cell 33, 729-740; QueenおよびBaltimore(1983) Cell 33, 741-748)のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター(例えば、神経線維プロモーター; ByrneおよびRuddle(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5473-5477)、腺臓特異的プロモーター(Edlundら(1985) Science 230, 912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4,873,316号および欧州出願公開番号264,166)が挙げられるがそれらに限定されない。

【0137】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

【0138】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0139】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A.ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook Jら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

【0140】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

【0141】

本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

【0142】

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia属、Serratia属、Bacillus属、Brevibacterium属、Corynebacterium属、Microbacterium属、Pseudomonas属などに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示される。

【0143】

本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラッ

ト・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aなどが例示される。

【0144】

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法【Methods. Enzymol., 194, 182（1990）】、リポフェクション法、スフェロプラスト法【Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929（1978）】、酢酸リチウム法【J. Bacteriol., 153, 163（1983）】、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929（1978）記載の方法などが例示される。

【0145】

本明細書において、レトロウイルスの感染方法は、例えば、Current Protocols in Molecular Biology 前出（特にUnits 9.9-9.14）などに記載されるように、当該分野において周知であり、例えば、トリプシナイズして胚性幹細胞を単一細胞懸濁物（single-cell suspension）にした後、ウイルス産生細胞（virus-producing cells）（パッケージング細胞株＝packaging cell lines）の培養上清と一緒に1～2時間共培養（co-culture）することにより、十分量の感染細胞を得ることができる。

【0146】

本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法において用いられる、Cre酵素の一過的発現、染色体上でのDNAマッピングなどは、細胞工学別冊実験プロトコールシリーズ「FISH実験プロトコール ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社（東京）などに記載されるように、当該分野において周知である。

【0147】

本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat. Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

【0148】

本明細書において使用される用語「基板」および「支持体」は、本明細書において、同じ意味で使用され、本発明のアレイが構築される材料（好ましくは固体）をいう。基板の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

【0149】

基板として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）以下が挙げられるがそれらに限定されない。基板は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いることができる。本発明においてはまた、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、PVDF膜など、プロッティングに使用される膜を用いることもできる。ナイロン膜が好ましい。ナイロン膜を用いた場合は、簡便な解析システムを用いて結果を分析することができるからである。しかし、高密度のものを解析する場合は、ガラスなど硬度のあるものを材料として使用することが好ましい。

【0150】

本明細書において「チップ」または「マイクロチップ」とは、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。本明細書において、「DNAチップ」とは、基板と、DNAとを含み、その基板にはDNA（例えば、cDNA断片）が少なくとも1つ配置されている。本明細書において、「プロテインチップ」とは、基板と、タンパク質とを含み、その基板にはタンパク質（例えば、ポリペプチドまたはオリゴペプチド）が少なくとも1つ配置されている。「DNAチップ」および「プロテインチップ」は、本明細書では、「マイクロチップ」または単に「チップ」に含まれる。「マイクロアレイ」とは、そのようなチップ上に1以上の生体分子（例えば、cDNA断片のようなオリゴヌクレオチド、またはペプチド）が整列されて配置されたものをいう。

【0151】

本発明において使用される生体分子（たとえば、DNAのようなオリゴヌクレオチド、またはペプチド）は、生体から採取されたものを利用し得るほか、当業者に公知の方法によって化学的に合成され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystemsなどにより市販されるDNA合成機もしくはペプチド合成機の何れかを用いて、自動化学合成により調製され得る。自動オリゴヌクレオチドの合成のための組成物および方法は、例えば、米国特許第4,415,732号、Caruthers et al. (1983)；米国特許第4,500,707号およびCaruthers (1985)；米国特許第4,668,777号、Caruthers et al. (1987)に開示される。

【0152】

基板には、任意の数の生体分子（例えば、DNAまたはペプチド）が配置され得るが、通常、基板1つあたり、 10^8 個の生体分子まで、他の実施形態において 10^7 個の生体分子まで、 10^6 個の生体分子まで、 10^5 個の生体分子まで、 10^4 個の生体分子まで、 10^3 個の生体分子まで、または 10^2 個の生体分子までの個の生体分子が配置され得る。これらの場合において、基板の大きさはより小さいことが好ましい。特に、生体分子

(例えば、DNAまたはペプチド)のスポットの大きさは、単一の生体分子のサイズと同じ小さくあり得る(これは、1-2 nmの桁であり得る)。最小限の基板の面積は、いくつかの場合において基板上の生体分子の数によって決定される。

【0153】

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子をいう。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸(例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など)、これらの複合分子などが包含されるがそれらに限定されない。本明細書では、生体分子は、好ましくは、ペプチド、DNAまたはRNAであり得る。

【0154】

本明細書において「発現量」とは、対象となる細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

【0155】

本明細書において「上流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの5'末端に向かう位置を示す。

【0156】

本明細書において「下流」という用語は、特定の基準点からポリヌクレオチドの3'末端に向かう位置を示す。

【0157】

本明細書において「塩基対の」および「Watson & Crick塩基対の」という表現は、本明細書では同義に用いられ、二重らせん状のDNAにおいて見られるものと同様に、アデニン残基が2つの水素結合によってチミン残基またはウラシル残基と結合し、3つの水素結合によってシトシン残基とグアニン残基とが結合するという配列の正体に基づいて互いに水素結合可能なヌクレオチドを示す(Stryer, L., Biochemistry, 4th edition, 1995を参照)。このような塩基対は、相互作用を考慮する際に重要である。

【0158】

本明細書において「相補的」または「相補体」という用語は、本明細書では、相補領域全体がそのまま別の特定のポリヌクレオチドとWatson & Crick塩基対を形成することのできるポリヌクレオチドの配列を示す。本発明の目的で、第1のポリヌクレオチドの各塩基がその相補塩基と対になっている場合に、この第1のポリヌクレオチドは第2のポリヌクレオチドと相補であるとみなす。相補塩基は一般に、AとT(あるいはAとU)、またはCとGである。本願明細書では、「相補」という語を「相補ポリヌクレオチド」、「相補核酸」および「相補ヌクレオチド配列」の同義語として使用する。これらの用語は、その配列のみに基づいてポリヌクレオチドの対に適用されるものであり、2つのポリヌクレオチドが事実上結合状態にある特定のセットに適用されるものではない。

【0159】

本明細書において使用される場合、「キット」とは、複数の容器、および製造業者の指示書を含み、そして各々の容器が、本発明の薬学的組成物、その他の薬剤、およびキャリアを含む製品をいう。

【0160】

本明細書において使用される場合、「被検体」とは、本発明の薬学的組成物が投与される対象であり、ヒト、マウス、ウシ、ニワトリなどの動物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または薬学的アジュバント。

【0162】

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間－1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0163】

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

【0164】

（好ましい実施形態の説明）

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にして、本発明の範囲内にある変更、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。

【0165】

（ポリペプチドの製造方法）

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明に係るポリペプチドを製造することができる。

【0166】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0167】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等

の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

【0168】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0169】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。

【0170】

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中に必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0171】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。遺伝子を導入した細胞または器官は、ジャーファーメンターを用いて大量培養することができる。

【0172】

例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地(The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967))、EagleのMEM培地(Science, 122, 501 (1952))、DMEM培地(Virology, 8, 396 (1959))、199培地(Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950))またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0173】

培養は、通常pH6～8、25～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0174】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-Sephacrose、DIAION HPA-75(三菱化成)等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(Pharmacia)等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用い

たゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

【0175】

本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-Sephacrose、DIAION HP A-75（三菱化成）等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia）等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。

【0176】

本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0177】

また、通常のタンパク質の精製方法【J. E. van. Sadlerら：Methods in Enzymology, 83, 458】に準じて精製できる。また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる【山川彰夫，実験医学（Experimental Medicine），13, 469-474（1995）】。例えば、Loweらの方法【Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227-8231（1989）, Genes Develop., 4, 1288（1990）】に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0178】

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる【Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227（1989）, Genes Develop., 4, 1288（1990）】。このような融合タンパク質では、発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位は、融合タンパク質の精製に続いて、融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にするために、融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入される。このような酵素およびこれらの同族の認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する、pGEX（Pharmacia Biotech；SmithおよびJohnson（1988）Gene 67, 31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, Mass.）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, N. J.）が挙げられる。

【0179】

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法【J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168 (1991)】に準じて、in vitro 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

【0180】

本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech、Applied Biosystems、Pharmacia Biotech、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0181】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。本発明のポリペプチドの生理活性は、公知の測定法に準じて測定することができる。

【0182】

本発明において有用な可溶性ポリペプチドの産生もまた、当該分野で公知の種々の方法によって達成され得る。例えば、ポリペプチドは、エキソペプチダーゼ、エンドマン分解またはその両方と組み合わせて特定のエンドペプチダーゼを使用することによるタンパク質分解によって、インタクトなポリペプチド分子から誘導され得る。このインタクトなポリペプチド分子は、従来の方法を使用して、その天然の供給源から精製され得る。あるいは、インタクトなポリペプチドは、cDNA、発現ベクターおよび組換え遺伝子発現のための周知技術を利用する組換えDNA技術によって生成され得る。

【0183】

好ましくは、本発明において有用な可溶性ポリペプチドは、直接的に産生され、従って、出発材料としてのポリペプチド全体の必要性を排除する。これは、従来の化学合成技術によって達成され得るか、または周知の組換えDNA技術（ここで、所望のペプチドをコードするDNA配列のみが形質転換された宿主で発現される）によって達成され得る。例えば、所望の可溶性ポリペプチドをコードする遺伝子は、オリゴヌクレオチド合成機を使用する化学的手段によって合成され得る。このようなオリゴヌクレオチドは、所望の可溶性ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計される。所望のペプチドをコードする特定のDNA配列はまた、特定の制限エンドヌクレアーゼフラグメントの単離によってか、またはcDNAからの特定の領域のPCR合成によって、全長DNA配列から誘導され得る。

【0184】

（変異型ポリペプチドの作製方法）

本発明のポリペプチドのアミノ酸の欠失、置換もしくは付加（融合を含む）は、周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)

、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO85/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0185】

(合成化学)

本明細書におけるペプチド、化学物質、低分子などの因子は、合成化学技術を用いて合成することができる。そのような合成化学技術は、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような周知技術としては、例えば、Fiesers' Reagents for Organic Synthesis (Fieser's Reagents for Organic Synthesis) Tse-Lok Ho, John Wiley & Sons Inc (2002)などを参照することができる。

【0186】

本発明の因子が化合物として利用される場合、塩形態で用いることができる。「塩」としては、製薬上許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩としては、塩酸、フッ化水素酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸、過塩素酸、ヨウ化水素酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、マンデル酸、アスコルビン酸、乳酸、グルコン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

【0187】

本発明の因子が化合物として利用される場合、水和物形態で用いることができる。「水和物」としては、薬理学的に許容される水和物が好ましく、また、含水塩も含まれ。具体的には、一水和物、二水和物、六水和物等が挙げられる。

【0188】

(免疫化学)

本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

【0189】

抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法【酵素免疫測定法 (ELISA法)：医学書院刊 1976年、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)】等で確認する。

【0190】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髓腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用することができる。

【0191】

このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイプレートを用いるE L I S A法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。

【0192】

また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエпитープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチE L I S A法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のタンパク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。

【0193】

本発明のポリペプチドのm R N Aの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはD N Aより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはP C R法により、本発明のポリペプチドをコードするD N Aの発現量をm R N Aレベルで定量することができる。このような技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

【0194】

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、K u t m e i e rら、B i o T e c h n i q u e s 17:242(1994)に記載されるように）、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでP C Rによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0195】

抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体c D N Aライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたc D N Aライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA + R N A））から、例えば、抗体をコードするc D N Aライブラリーからのc D N Aクローンを同定するために、その配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するP C R増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。P C Rによって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【0196】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌ

クレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrookら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

【0197】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域（CDR）の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278:457-479（1998）を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【0198】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855（1984）；Neubergerら、Nature 312:604-608（1984）；Takedaら、Nature 314:452-454（1985））が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

【0199】

単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術（米国特許第4,946,778号；Bird、Science 242:423-42（1988）；Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883（1988）；およびWardら、Nature 334:544-54（1989））が、利用され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る（Skerrraら、Science 242:1038-1041（1988））。

【0200】

（抗体を産生する方法）

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成

によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

【0201】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ（例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体）の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分（好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域（例えば、PCT公開 WO 86/05807；PCT公開 WO 89/01036；および米国特許第5,122,464号を参照のこと）をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

【0202】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

【0203】

本発明の関連した局面において、薬学的組成物（例えば、ワクチン組成物）が、予防適用または治療適用のために提供される。このような組成物は、一般に、本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび免疫刺激剤（例えば、アジュバント）を含む。

【0204】

本発明の抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって、本発明のポリペプチドなどを単離するために用いられ得る。ある因子に特異的な抗体は、細胞からの天然の因子、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生された因子の精製を容易にし得る。さらに、そのような抗体が、（例えば、細胞の溶解液または細胞上清における）本発明のタンパク質を検出するために用いられ、本発明のタンパク質の発現の存在の量およびパターンを評価し得る。このような抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に連結する（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易になり得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオ

レセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして、適切な放射性物質の例としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられるがそれらに限定されない。

【0205】

本発明の別の局面は、哺乳動物において、免疫応答を誘導するに十分な量のポリペプチドをこの哺乳動物に投与することにより本発明のポリペプチドに対する免疫応答を誘導する方法に関する。この量は、動物種、動物の大きさなどに依存するが、当業者により決定され得る。

【0206】

(スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。スクリーニングは、インビトロ、インビボなど実在物質を用いた系を使用してもよく、インシリコ（コンピュータを用いた系）の系を用いて生成されたライブラリーを用いてもよい。本発明では、所望の活性を有するスクリーニングによって得られた化合物もまた、本発明の範囲内に包含されることが理解される。また本発明では、本発明の開示をもとに、コンピュータモデリングによる薬物が提供されることも企図される。

【0207】

1 実施形態において、本発明は、本発明のタンパク質または本発明のポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはこれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチの任意のものを使用して得られ、これには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1 ピーズ 1 化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145）。

【0208】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909；Erbら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422；Zuckermannら (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678；Choら (1993) *Science* 261:1303；Carrellら (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059；Carrellら (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061；およびGallopら (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233。

【0209】

化合物のライブラリーは、溶液中で（例えば、Houghten (1992) *Bio Techniques* 13:412~421）、あるいはビーズ上（Lam (1991) *Nature* 354:82~84）、チップ上（Fodor (1993) *Nature* 364:555~556）、細菌（Ladner 米国特許第5,223,409号）、孢子（Ladner、上記）、プラスミド（Cullら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865~1869）またはファージ上（ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386~390；Devlin (1990) *Science* 249:404~406；Cwirllaら (1990

) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6378~6382; Felici (1991) J Mol Biol 222:301~310; Ladner 上記)において示され得る。

【0210】

(薬学的組成物)

本発明のポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む発現ベクターおよび遺伝子導入ベクター、アンチセンス核酸、ポリペプチド、ならびにポリペプチドに対する抗体は、血管内皮細胞増殖促進のため、c-fosプロモーターからの転写促進のため、VEGFプロモーターからの転写促進のため、および血管新生促進のため、ならびに、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患の処置、予防、診断または予後のための薬学的組成物の成分としても使用することが可能である。

【0211】

本明細書において薬剤の「有効量」とは、その薬剤が目的とする薬効が発揮することができる量をいう。本明細書において、そのような有効量のうち、最小の濃度を最小有効量ということがある。そのような最小有効量は、当該分野において周知であり、通常、薬剤の最小有効量は当業者によって決定されているか、または当業者は適宜決定することができる。そのような有効量の決定には、実際の投与のほか、動物モデルなどを用いることも可能である。本発明はまた、このような有効量を決定する際に有用である。

【0212】

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、賦形剤および／または農学的もしくは薬学的アジュバント。

【0213】

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報（例えば、疾患に関する情報）を元に、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明のモニタリング方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。疾患状態をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回—1ヶ月に1回）のモニタリングが挙げられる。1週間—1ヶ月に1回のモニタリングを、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0214】

本明細書において「指示書」は、本発明の治療方法などを医師、患者など投与を行う人に対して記載したものである。この指示書は、本発明の医薬などを例えば、放射線治療直後または直前（例えば、24時間以内など）に投与することを指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

【0215】

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための疾患レ

ベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

【0216】

本発明では、いったん類似の種類（例えば、ヒトに対するマウスなど）の生物、培養細胞、組織などに関し、ある特定の糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが相関付けられた場合、対応する糖鎖構造の分析結果と、疾患レベルとが相関付けることができることは、当業者は容易に理解する。そのような事項は、例えば、動物培養細胞マニュアル、瀬野ら編著、共立出版、1993年などに記載され支持されており、本明細書においてこのすべての記載を援用する。

【0217】

（遺伝子治療）

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら（編）, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

【0218】

遺伝子治療に使用される核酸構築物は、周知の遺伝子導入ベクターを用いて局所的にまたは全身的にのいずれかで投与され得る。そのような核酸構築物がタンパク質のコード配列を包含する場合、そのタンパク質の発現は、内因性の哺乳類のプロモーターまたは異種のプロモーターの使用により誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であり得るか、または調節され得る。

【0219】

種々の周知の遺伝子導入ベクターを遺伝子治療のための組成物として使用する場合、ベクターの投与は、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）または生理食塩水などに懸濁したベクター懸濁液の局所（例えば、癌組織内、肝臓内、筋肉内および脳内など）への直接注入か、または血管内（例えば、動脈内、静脈内および門脈内）への投与によりなされる。

【0220】

1つの実施態様において、遺伝子導入ベクターは、一般には、この遺伝子導入ベクターを単位用量注入可能な形態（溶液、懸濁液または乳濁液）で、薬学的に受容可能なキャリア（すなわち、使用された投薬量および濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、そして処方物の他の成分と適合性であるもの）とを混合することによって処方され得る。例えば、処方物は、好ましくは、酸化剤および遺伝子導入ベクターにとって有害であることが公知である他の化合物を含まない。

【0221】

キャリアは、等張性および化学的安定性を増強する物質のような微量の添加物を適宜含む。このような物質は、使用された投薬量および濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、そしてリン酸、クエン酸、コハク酸、酢酸、および他の有機酸またはそれらの塩のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、またはイムノグロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン）；単糖、二糖および他の炭水化物（セルロースまたはその誘導体、グルコー

ス、マンノース、またはデキストリンを含む)；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；対イオン（例えば、ナトリウム）；および／または非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート、ボロキサマー）、またはPEGを含み得る。

【0222】

遺伝子導入ベクターを含む薬学的組成物は、代表的には、単位または多用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルにおいて、水溶液として貯蔵され得る。

【0223】

遺伝子導入ベクターを含む薬学的組成物は医療実施基準（good medical practice）に一致した様式で、個々の患者の臨床状態（例えば、予防または処置されるべき状態）、遺伝子導入ベクターを含む組成物の送達部位、標的組織、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮しつつ処方され、そして投与される。

【0224】

例えば、ヒトにHVJ（センダイウイルス）エンベロープベクターを投与する場合、マウス一匹あたり、20～20,000HAU相当の、好ましくは60～6,000HAU相当の、より好ましくは200～2,000HAU相当のエンベロープベクターが投与される。投与されるエンベロープベクター中に含有される外来遺伝子の量は、マウス一匹あたり、0.1～100 μ g、好ましくは0.3～30 μ g、より好ましくは1～10 μ gである。

【0225】

また、ヒトにHVJ（センダイウイルス）エンベロープベクターを投与する場合、被験体あたり、400～400,000HAU相当の、好ましくは1,200～120,000HAU相当の、より好ましくは4,000～40,000HAU相当のエンベロープベクターが投与される。投与されるエンベロープベクター中に含有される外来遺伝子の量は、被験体あたり、2～2,000 μ g、好ましくは6～600 μ g、より好ましくは20～200 μ gである。

【0226】

本発明のポリペプチドを、上記の遺伝子治療において用いる方法と同様にして、遺伝子導入ベクター中に入れ、そしてそのポリペプチドを所望の部位に送達することも可能である。

【0227】

本発明のポリペプチドやポリヌクレオチドを疾病の治療に用いる場合には、例えば、骨格筋や心筋に直接注入する方法、ベクターに封入して導入する方法が考えられる。ベクターとしてはポリヌクレオチドの場合は、ウイルスベクター（アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターなど）や非ウイルスベクター（リボソーム、HVJ-Eなど）により直接注入や血管内投与によるターゲティングなどが可能である。またポリペプチドの場合は、HVJ-Eが好ましく、直接投与が効果的であると考えられる。またゼラチンハイドロゲルやアテロコラーゲン、ポリ乳酸に封入して虚血部位の近く（筋肉中、脳内、皮下など）に埋め込み徐放化させる方法もある。

【0228】

このような方法によって血管内皮細胞の増殖や遊走がおこり、管腔形成により血管が新生される。さらに血管平滑筋細胞の遊走により血管の補強が行われ、機能的な血管となって末梢にまで血液の供給が可能になる。これによって血管閉塞部位を周囲に側副血行路が生じ虚血部位への循環血液量が増強されるために、末梢血管病、虚血性心、脳疾患の治療が可能になる。

【0229】

VEGFを用いた遺伝子治療に関して、Isner, J. ら、Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. The Lancet 348, 370-374, (1996)；Baumgartner, I. ら、Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in pat

ients with clinical limb ischemia. *Circulation*, 97, 1114-1123, (1998); および Machens, H-G., ら, Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 in a rat flap model. *J. Surgical Research* 111, 136-142, (2003)が報告されている。

【0230】

血管新生ペプチドとしては、Li, J., et al.: pR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nature Medicine* 6, 49-55, (2000)、および Koczulla, R., et al.: An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111, 1665-1672, (2003)が報告されている。

【0231】

動物モデルとしては、couffinhal, T., et al.: Mouse model of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 152, 1667-1679, (1998)が報告されている。

【0232】

また、マウスやラット或いはラビットの大腿動脈の1つを結紮して除去し、これにより虚血部位を作成し、遺伝子や蛋白の筋肉内投与による治療効果を組織染色にによる血管数、レーザードップラーによる血流量、血管造影などにより判定することによって、血管新生を検出することも可能である。

【0233】

(本明細書において用いられる一般的技術)

本明細書において使用される技術は、そうではないと具体的に指示しない限り、当該分野の技術範囲内にある、糖鎖科学、マイクロフルイディクス、微細加工、有機化学、生化学、遺伝子工学、分子生物学、微生物学、遺伝学および関連する分野における周知慣用技術を使用する。そのような技術は、例えば、以下に列挙した文献および本明細書において他の場所において引用した文献においても十分に説明されている。

【0234】

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). *The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication*, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). *Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing*, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). *Fundamentals of Microfabrication*, CRC 15 Press; Rai-Choudhury, P. (1997). *Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithography*などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0235】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法、糖鎖科学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Maniatis, T. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor およびその 3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M., et al. eds, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., NY, 10158 (2000); Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Sninsky, J. J. et al. (1999). *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press; Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*

ach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acid in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Press; Method in Enzymology 230、242、247、Academic Press、1994; 別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

【0236】

（処方）

本発明はまた、有効量の治療剤の被験体への投与による、疾患または障害（例えば、感染症）の処置および／または予防の方法を提供する。治療剤は、薬学的に受容可能なキャリア型（例えば、滅菌キャリア）と組み合わせた、本発明の組成物を意味する。

【0237】

治療剤を、個々の患者の臨床状態（特に、治療剤単独処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準（GMP = good medical practice）を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮を行って決定される。

【0238】

一般的提案として、用量当り、非経口的に投与される治療剤の合計薬学的有効量は、患者体重の、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ～ $10 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ の範囲にあるが、上記のようにこれは治療的裁量に委ねられる。さらに好ましくは、本発明の細胞生理活性物質について、この用量は、少なくとも $0.01 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、最も好ましくはヒトに対して約 $0.01 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ と約 $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ との間である。連続投与する場合、代表的には、治療剤を約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ ～ 約 $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$ の投薬速度で1日に1～4回の注射かまたは連続皮下注入（例えばミニポンプを用いる）のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置期間および応答が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するようである。

【0239】

治療剤を、経口的、直腸内、非経口的、槽内（intracisternally）、腔内、腹腔内、局所的（粉剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与し得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の処方補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【0240】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、経口的、直腸内、非経口的、槽内（intracisternally）、腔内、腹腔内、局所的（粉剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与され得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の処方補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、

皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【0241】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、適切なポリマー物質（例えば、成形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態の半透過性ポリマーマトリックス）、適切な疎水性物質（例えば、許容品質油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂、および貧可溶性誘導体（例えば、貧可溶性塩）を包含する。

【0242】

徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP58,481）、L-グルタミン酸およびγ-エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら、Biopolymers 22:547-556（1983））、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277（1981））、およびLanger, Chem. Tech. 12:98-105（1982））、エチレンビニルアセテート（Langerら、同書）またはポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988）が挙げられる。

【0243】

徐放性治療剤はまた、リポソームに包括された本発明の治療剤を包含する（一般に、Langer, Science 249:1527-1533（1990）；Treatra, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler（編）, Liss, New York, 317-327頁および353-365（1989）を参照のこと）。治療剤を含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製され得る：DE3,218,121；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692（1985）；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034（1980）；EP52,322；EP36,676；EP88,046；EP143,949；EP142,641；日本国特許出願第83-118008号；米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号ならびにEP第102,324号。通常、リポソームは、小さな（約200～800Å）ユニラメラ型であり、そこでは、脂質含有量は、約30モル%コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適治療剤のために調整される。

【0244】

なおさらなる実施態様において、本発明の治療剤は、ポンプにより送達される（Langer、前出；Sef-ton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201（1987）；Buchwaldら、Surgery 88:507（1980）；Saudekら、N. Engl. J. Med. 321:574（1989）を参照のこと）。

【0245】

他の制御放出系は、Langer（Science 249:1527-1533（1990））による総説において議論される。

【0246】

非経口投与のために、1つの実施態様において、一般に、治療剤は、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア、すなわち用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するものと、単位投薬量の注射可能な形態（溶液、懸濁液または乳濁液）で混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化、および治療剤に対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

【0247】

一般に、治療剤を液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはその両方と均一お

よび緊密に接触させて処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリア、より好ましくはレシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が挙げられる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リボソームと同様に本明細書において有用である。

【0248】

キャリアは、等張性および化学安定性を高める物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、このような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量（約10残基より少ない）ポリペプチド（例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸；セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような対イオン；および／またはポリソルベート、ポロキサマーもしくはPEGのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0249】

治療剤は、代表的には約0.1mg/ml～100mg/ml、好ましくは1～10mg/mlの濃度で、約3～8のpHで、このようなビヒクル中に処方される。前記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、塩が形成されることが理解される。

【0250】

治療的投与に用いられるべき任意の薬剤は、有効成分としてのウイルス以外の生物・ウイルスを含まない状態、すなわち、無菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンメンブレン）で濾過することにより無菌状態は容易に達成される。一般に、治療剤は、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。

【0251】

治療剤は、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンブルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵される。凍結乾燥処方物の例として、10mlのバイアルに、滅菌濾過した1%（w/v）治療剤水溶液5mlを充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥した治療剤を、注射用静菌水を用いて再構成して注入溶液を調製する。

【0252】

本発明はまた、本発明の治療剤の1つ以上の成分を満たした一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、治療剤を他の治療用化合物と組み合わせて使用し得る。

【0253】

本発明の治療剤は、単独または他の治療剤と組合わせて投与され得る。組合わせは、例えば、混合物として同時に；同時にまたは並行してだが別々に；あるいは経時的のいずれかで投与され得る。これは、組み合わされた薬剤が、治療用混合物として共に投与されるという提示、およびまた、組み合わされた薬剤が、別々にしかし同時に、例えば、同じ個体に別々の静脈ラインを通じて投与される手順を含む。「組み合わせて」の投与は、一番目、続いて二番目に与えられる化合物または薬剤のうち1つの別々の投与をさらに含む。

【0254】

特定の実施態様において、本発明の薬学的組成物は、抗がん剤との組み合わせで投与される。

【0255】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、他の治療レジメまたは予防レジメ（例えば、放射線治療）と組合わせて投与される。

【0256】

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0257】

（実施例1：ウイルスエンベロープ由来のタンパク質を含む成分中に外来遺伝子を封入した遺伝子導入ベクターの調製および使用）

（ウイルスの調製）

HVJ、Z株を、先に記載のように（Kaneda、Cell Biology：A Laboratory Handbook, J. E. Celis (Ed.), Academic Press, Orlando, Florida, vol. 3, pp. 50-57 (1994)）差示的遠心分離により精製した。精製HVJを平衡化塩溶液（BSS：137mM NaCl、5.4mM KCl、10mM Tris-HCl、pH7.5）中に再懸濁し、そしてウイルス力価を、540nmにおける吸光度を測定することにより決定した。540nmにおける光学的密度は、15,000血球凝集単位（HAU）に対応し、融合活性と相関する。

【0258】

（遺伝子導入ベクターの調製）

3.56mg ホスファチジルコリンおよび0.44mg コレステロールの脂質混合物を、クロロホルム中に溶解し、そしてこの脂質溶液を、ロータリーエバポレーター中で蒸発させた（Uchidaら、J. Cell Biol. 80:10-20 (1979)）。乾燥脂質混合物を、0.85% NP-40を含む2.0mlの上記素通り画分からのタンパク質溶液（1.6mg）中にボルテックスにより完全に溶解した。次いで、この溶液を0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.2）に対して透析し、NP-40を除去した。透析は、毎日緩衝液を交換して6日間実施した。この透析された溶液を、0.3M スクロースおよび1mM KClを含む10mMリン酸緩衝液（pH5.2）で平衡化したアガロースビーズ（Bio-Gel A-50m）（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）にアプライした。540nmにおける光学的密度が1.5を超える画分を再構成融合粒子として集め、そして以下に記載のように10mg脂質から調製された核酸充填リポソームと融合し、遺伝子導入ベクターを調製した。

【0259】

（ヒトHEK293株由来のトランスフェクト細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子発現）

上記の方法で調製した遺伝子導入ベクターの遺伝子導入活性を確認するために、ヒトHEK293株およびルシフェラーゼ遺伝子を、以下のように用いた。

【0260】

pCMV-ルシフェラーゼ（7.4kb）を、pGEM-luc（Promega Corp., Madison, WI, USA）からのルシフェラーゼ遺伝子を、pcDNA3（5.4kb）（Invitrogen, San Diego, CA, USA）中に、HindIIIおよびBamHI部位でクローニングすることにより構築した。約40μgのpCMV-ルシフェラーゼを含む遺伝子導入ベクターを、先に記載のように構築し、そしてこの遺伝子導入ベクター（約 1.5×10^{11} 粒子/ml、DNA濃度は約40μg/ml）の1/10量（100μl）を、ヒト293細胞株（ヒト胎児腎臓：HEK）由来の 2×10^5 細胞とインキュベートした。HVJリポソームを用いて、また同量のル

シフェラーゼDNAを 2×10^5 HEK 293細胞に導入した。導入24時間後、細胞を回収し、そして他に記載のように（Saekiら、Hum. Gene Ther., 8: 1965-1972 (1997)）、ルシフェラーゼ活性アッセイを確認した。

【0261】

（実施例2：界面活性剤を用いる不活性化HVJエンベロープベクターの調製および使用）

（1：HVJの増殖）

HVJは鶏の受精卵への種ウイルスの接種により増殖されたものが一般に使用され得るが、サル、ヒトなどの培養細胞、培養組織へのウイルスの持続感染系（トリプシンなどの加水分解酵素を培養液中に添加）を利用して増殖させたもの、クローニングされたウイルスゲノムを培養細胞に感染させ持続感染をおこさせて増殖させたもの、全てが利用可能である。

【0262】

本実施例において、HVJの増殖を以下のようにおこなった。

【0263】

HVJの種ウイルスを、SPF（Specific pathogen free）の受精卵を使って増殖させ分離・精製したHVJ（Z種）を細胞保存用チューブに分注し、10% DMSOを加えて液体窒素中に保存し、調製した。

【0264】

受精直後のニワトリ卵を入荷し、インキュベーター（SHOWA-FURANKI P-03型；約300鶏卵収容）にいれ、36.5℃、湿度40%以上の条件で10～14日飼育した。暗室中で、検卵器（電球の光が口径約1.5cmの窓を通して出るようになっていたもの）を用いて、胚の生存及び気室と漿尿膜を確認し、漿尿膜の約5mm上方に鉛筆でウイルス注入箇所の記しをつけた（太い血管を除いた場所を選定する）。ポリペプトン溶液（1%ポリペプトン、0.2% NaClを混合し、1M NaOHでpH7.2に調整してオートクレーブ滅菌し、4℃保存したもの）で種ウイルス（液体窒素からとりだしたもの）を500倍に希釈し、4℃においた。卵をイソジン及びアルコールで消毒し、ウイルス注入箇所に千枚通しで小孔をあけ、希釈した種ウイルス0.1mlを26ゲージの針付き1mlシリンジを用いて、漿尿腔内に入るように注入した。溶かしたパラフィン（融点50～52℃）をパスツールピペットを用いて孔の上に置きこれをふさいだ。卵をインキュベーターにいれ、36.5℃、湿度40%以上の条件で3日飼育した。次に、接種卵を一晩4℃においた。翌日、卵の気室部分をピンセットで割り、18ゲージの針を付けた10mlシリンジを漿尿膜の中に入れて、漿尿液を吸引し、滅菌ボトルに集め、4℃に保存した。

【0265】

（2：HVJの精製）

HVJは、遠心分離による精製方法、カラムによる精製方法、または当該分野において公知のその他の精製方法によって、精製され得る。

（2.1：遠心分離による精製方法）

手短には、増殖させたウイルス液を回収し低速遠心で培養液や漿尿液中の組織・細胞片を除去した。その上清を高速遠心（27,500×g、30分間）とショ糖密度勾配（30～60% w/v）を利用した超遠心（62,800×g、90分間）により精製した。精製の間にウイルスをできるだけ穏和に扱い、4℃で保存することに注意すべきである。

【0266】

本実施例において、具体的には、以下の方法によってHVJを精製した。

【0267】

HVJ含有漿尿液（HVJ含有のニワトリ卵の漿尿液を集め4℃にて保存）の約100mlを広口の駒込ピペットで50mlの遠心チューブ2本に入れ（Saeki, Y., およびKaneda, Y.: Protein modified liposomes (HVJ-liposomes) for the delivery of genes, ol

igonucleotides and proteins. Cell Biology; A laboratory handbook (第2版) J. E. Celis 編 (Academic Press Inc., San Diego) 第4巻、127～135、1998を参照のこと)、低速遠心機で3000 rpm、10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、卵の組織片を除去した。

【0268】

遠心後、上清を35 ml 遠心チューブ4本(高速遠心用)に分注し、アングルローターで27,000 g, 30分遠心した(アクセル、ブレーキはオン)。上清を除き、沈殿にBSS(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、137 mM NaCl、5.4 mM KCl; オートクレーブし、4℃保存)(BSSのかわりにPBSでも可能)をチューブ当たり約5 ml 加え、そのまま4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし1本のチューブに集め、同様にアングルローターで27,000 g、30分遠心した。上清をのぞき沈殿にBSS約10 mlを加え、同様に4℃で一晩静置した。広口の駒込ピペットでゆるやかにピペッティングして沈殿をほぐし、低速遠心機で3000 rpm, 10分、4℃で遠心し(ブレーキはオフ)、除ききれなかった組織片やウイルスの凝集塊をのぞいた。上清を新しい滅菌済みチューブに入れ精製ウイルスとして4℃で保存する。

【0269】

このウイルス液0.1 mlにBSSを0.9 ml加え、分光光度計で540 nmの吸収を測定し、ウイルス力価を赤血球凝集活性(HAU)に換算した。540 nmの吸収値1がほぼ15,000 HAUに相当した。HAUは融合活性とほぼ比例すると考えられる。また実際にニワトリ赤血球液(0.5%)を用いて、赤血球凝集活性を測定してもよい(動物細胞利用実用化マニュアル、REALIZE INC. (内田、大石、古沢編集) P 259～268、1984を参照のこと)。

【0270】

さらにショ糖密度勾配を用いたHVJの精製も必要に応じて行い得る。具体的には、ウイルス懸濁液を60%、30%のショ糖溶液(オートクレーブ滅菌)を重ねた遠心チューブにのせ、62,800×gで120分間密度勾配遠心を行う。遠心後、60%ショ糖溶液層上にみられるバンドを回収する。回収したウイルス懸濁液をBSSもしくはPBSを外液として4℃で透析を一晩行い、ショ糖を除去する。すぐに使用しない場合は、ウイルス懸濁液にグリセロール(オートクレーブ滅菌)と0.5 M EDTA液(オートクレーブ滅菌)をそれぞれ最終濃度が10%と2～10 mMになるように加えて-80℃で穏やかに凍結し、最終的に液体窒素中で保存する(凍結保存はグリセロールと0.5 M EDTA液の代わりに10 mM DMSOでも可能)。

(2.2: カラムおよび限外濾過による精製方法)

遠心分離による精製方法に代えて、カラムによるHVJの精製も本発明に適用可能である。

【0271】

手短には、分子量カットオフが50,000のフィルターによる限外濾過による濃縮(約10倍)とイオン交換クロマトグラフィー(0.3 M～1 M NaCl)による溶出を用いて精製した。

【0272】

具体的には、本実施例において、以下の方法を使用して、HVJをカラムによって精製した。

【0273】

漿尿液を採集した後、80 μm～10 μmのメンブランフィルターにてろ過した。0.006～0.008% BPL(最終濃度)を漿尿液に加え(4℃、1時間)、HVJを不活性化した。漿尿液を37℃、2時間インキュベートすることによって、BPLを不活性化した。

【0274】

500 KMWC O (A/G Technology、Needham、Massachusetts) を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法により約10倍濃縮した。緩衝液として、50 mM NaCl、1 mM MgCl₂、2% マンニトール、20 mM Tris (pH 7.5) を用いた。HAUアッセイにより、ほぼ100%のHVJ回収率であり優れた結果がえられた。

【0275】

Q Sepharose FF (アマシャムファルマシアバイオテクKK、Tokyo) によるカラムクロマトグラフィー法 (緩衝液: 20 mM Tris HCl (pH 7.5)、0.2~1 M NaCl) でHVJを精製した。40~50%の回収率であり、純度は99%以上であった。

【0276】

500 KMWC O (A/G Technology) を用いたタンジェンシャルフロー限外ろ過法によりHVJの画分を濃縮した。

【0277】

(3: HVJの不活性化)

HVJの不活性化が必要な場合、以下に記載するように、紫外線照射またはアルキル化剤処理により行った。

【0278】

(3.1: 紫外線照射法)

HVJ懸濁液1 mlを30 mm径のシャーレにとり、99または198ミリジュール/cm²を照射した。ガンマー線照射も利用可能である(5~20グレイ)が完全な不活性化がおこらない。

【0279】

(3.2: アルキル化剤による処理)

使用直前に、10 mM KH₂PO₄中に0.01% β-プロピオラク톤の調製をした。作業中は低温下に保ち素早く作業を行った。

【0280】

精製直後のHVJの懸濁液に最終0.01%になるようにβ-プロピオラク톤を添加し、氷上で60分間でインキュベートした。その後2時間、37℃でインキュベートした。エッペンドルフチューブにチューブあたり10,000 HAU分ずつ分注し、15,000 rpm、15分遠心し、沈殿を-20℃で保存する。上記の不活性化法によらず、沈殿を-20℃で保存せず、そのまま界面活性剤処理によりDNAを取り込ませ、ベクターを作成することも可能である。

【0281】

(4: HVJエンベロープベクターの作成)

保存してあったHVJに外来DNA 200~800 μgを含む溶液92 μlを加えてピペティングでよく懸濁した。この溶液は、-20℃で、少なくとも、3ヶ月保存可能である。HVJとの混合前にDNAに硫酸プロタミンを添加すると、発現効率が2倍以上増強した。

【0282】

この混合液を氷上に1分間置き、オクチルグルコシド(10%)を8 μl加えて15秒氷上でチューブを振盪し、45秒氷上に静置した。界面活性剤での処理時間は、1~5分間が好ましい。オクチルグルコシド以外に、Triton-X100 (n-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)、CHAPS (3-[3-コラミドプロピル]-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、NP-40 (ノニルフェノキシポリエトキシエタノール)などの界面活性剤も使用し得る。Triton-X100、NP-40およびCHAPSの好ましい最終濃度は、それぞれ、0.24~0.80%、0.04~0.12%および1.2~2.0%である。

【0283】

冷BSSを1 ml添加し、すぐに15,000 rpmで15分遠心した。生じた沈殿に

PBSまたは生理食塩水などを300 μ l加えて、ボルテックス、ピペティングで懸濁した。懸濁液は直接遺伝子導入に使用することも、-20℃で保存後に遺伝子導入に使用することも可能である。このHVJエンベロープベクターは、少なくとも2ヶ月間の保存後、同程度の遺伝子導入効率を維持した。

【0284】

(5:HVJエンベロープベクターによる細胞内への遺伝子導入)

(遺伝子導入方法)

1,000HAU分をエッペンドルフチューブにとり(30 μ l)、硫酸プロタミン(1mg/ml)5 μ lを加えた。BHK-21細胞(前日に、ウェルあたり200,000個で、6つのウェルにまいたもの)の培地を交換し、1ウェルあたり0.5mlの培地(10%FCS-DMEM)を添加した。各ウェルに、上記のベクター(1,000HAU相当)と硫酸プロタミンの混合液を加え、プレートを前後左右にふってベクターと細胞を良く混ぜ合わせ、37℃で、5%CO₂インキュベーター中に10分間放置した。

【0285】

培地交換し、37℃で、5%CO₂インキュベーター中でオーバーナイト(16hr~24hr)放置し、遺伝子発現を調べた。ルシフェラーゼ(pLuci;CMVプロモーターを有するルシフェラーゼ遺伝子)の場合は、Cell Lysis Buffer(Promega)0.5mlで細胞を溶解し、その20 μ l溶液中の活性をルシフェラーゼアッセイキット(Promega)を用いて測定した。グリーン蛍光タンパク質(pCMV-GFP;Promega)の場合は、そのまま蛍光顕微鏡で観察し、400倍率で5~8視野を観察し、蛍光を発する細胞の割合を算出した。

【0286】

(実施例3:ヒト心臓cDNAライブラリーからの血管内皮増殖因子をコードする遺伝子の単離および解析)

本発明を用いることによって、所望の機能的性質を有する目的遺伝子を分離することが可能である。その分離方法の実施形態の1つを模式的に図1に示す。

【0287】

実際に、本明細書の実施例2で調製した遺伝子導入ベクターを使用して、血管内皮増殖因子をコードする遺伝子を単離した。なお、本実施例に例示される遺伝子の単離法には、本明細書の実施例2で調製した遺伝子導入ベクターのみならず、任意の「ウイルスエンベロープベクター」および「リボソームベクター」が使用可能である。

【0288】

ヒト心臓cDNAライブラリー(GIBCO BRL社;ヒト心臓由来cDNAを、CMVプロモーターを有するプラスミドpSPORTに連結したプラスミド)をE.coli DH12Sに導入し、そのE.coliから、プラスミドを調製した。プラスミド200 μ gを、10000HAUのHVJ-E遺伝子導入ベクター(本発明の実施例2で調製した遺伝子導入ベクター、 3×10^9 particle)に封入した。宿主細胞として、ヒト大動脈内皮細胞HEAC(三光純薬)約5000細胞を、96ウェルマクロタイタープレートの各ウェルに培地とともに添加して、一晚培養した細胞を用いた。宿主細胞を含んだ各ウェルに対して、上記HVJ-Eの100分の1量を添加し、37℃ 30分間放置した後、培地交換をした。

【0289】

使用した培地は、血清濃度を1%とした低栄養状態のもので、この状態下で、1週間培養を行う。この条件下では、HEACの増殖は確認されなかった。

【0290】

2週間後、細胞増殖アッセイを行った。試薬として、Cell Titer 96(Promega社)を用い、ミトコンドリアの酸化還元状態を試薬の色調の変化として捉えて、細胞増殖の指標とした。

【0291】

最も色の濃いウェルは、最も活発に細胞増殖が行われた細胞が存在するウェルである。

そこで、マイクロタイタープレート全体をプレートリーダーで読み取り、その細胞増殖を、コンピュータによりグラフ化した。このグラフから、最も増殖作用を示す2つのウェル内の細胞から、Qiagen社のDNeasy Tissue Kitを用いて、核酸を調製した。調製した核酸には、プラスミドDNAが含まれるので、これをコンピテントなE. coli (DH5 α ; 宝酒造) に熱ショック法を用いて導入した。

【0292】

このE. coliをアンピシリン含有プレート培地に播種し、コロニーを形成させた。1つのウェルより調製したDNAから、約20～200個のコロニーを得ることができた。各コロニーからプラスミドDNA (pDNA) を抽出し、制限酵素処理によって、プラスミド内の遺伝子フラグメントの存在を確認した。その結果、調製したプラスミドのうち、約60～70%のプラスミドが、挿入物を有するプラスミドであった。

【0293】

次に、Qiagen社のEndo Free Plasmid Maxi Kitを用いて、プラスミドDNAを精製し、その精製したプラスミドをHVJ-Eに封入して、再度HAEC細胞に導入し、同様の細胞増殖実験を行った。この細胞増殖実験において、有意に高い細胞増殖を示したプラスミドが、血管内皮増殖因子をコードする核酸を含むことが予想される候補プラスミドである。

【0294】

インサートをもつ9個のクローンをそれぞれHVJ-Eに封入して2回目のスクリーニングを施行したところ、高い増殖作用を示す遺伝子を得られた。さらに新たに2つ得られ計3つの遺伝子が常に高いHAEC増殖能を示した。この3つについては再検、再々検によってもHAEC増殖能が確認された。増殖能をさらに確認するために、細胞増殖の最初期に活性化されるプロトオンコジーンc-fosのプロモーターを用いたアッセイを行った。実際にはこのプロモーター下にルシフェラーゼを連結した遺伝子c-fos-Luciと候補遺伝子を1:1の重量比でウシ血管内皮細胞にリポフェクションによって導入し24-48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。図2に示すように、3つの遺伝子 (p3743、M3-10-G08、M3-13-A06) はHGFよりも高いルシフェラーゼ活性を示し、これら遺伝子産物によるc-fosプロモーターの強力な活性化が示された。この中で最も高い活性を示したp3743についてVEGFプロモーターを連結したルシフェラーゼ遺伝子を用いて上述のようにプロモーターアッセイを行ったところ、図3の右の図のようにVEGFよりも高いVEGFプロモーターの活性化を示した。すなわちこの遺伝子産物によりVEGFの分泌が促進され、既知の血管新生遺伝子の活性化を行うことによる血管新生の可能性が示された。ちなみに図6の左のグラフにあるようにp3743はVEGFよりもc-fosプロモーターの活性化能は高かった。次にp3743の細胞増殖能についてヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) とヒト血管平滑筋細胞 (VSMC) に対して調べたところ、図4のようにHAECを宿主細胞として用いた場合、単離した核酸は、HGFよりも高い増殖能を有していた。しかし、ヒト血管平滑筋細胞を用いた場合は、ネガティブコントロールのGFPと同様の活性であった。

【0295】

(血管新生活性)

クラボウの血管新生キット (Angiogenesis Kit, KZ-1000, 倉敷紡績株式会社) を用いて管腔形成を調べた。対照として、ブランク、血管内皮細胞増殖因子-Aタンパク質 (VEGF-A)、pVEGFプラスミド (血管内皮細胞増殖因子をコードする遺伝子を含むプラスミド)、pSP-ORT1 (血管内皮細胞増殖因子をコードする遺伝子を含まないプラスミド) を用いた。

【0296】

血管新生専用培地 (倉敷紡績 (株) KZ-1400) 中へ、VEGF-E (NZ-7) 10 ng/ml を添加した培地へ、さらに抗ヒトVEGF-A中和抗体を0、250、500、1000 ng/ml の各濃度となるように添加して培養した。

【0297】

抗ヒトVEGF-A中和抗体としては、Anti-VEGF, Human, Mouse-Mono (26503.111) (R&D社製 カタログNo. MAB293) を用いた。培養は37℃、5% CO₂ インキュベ

ーターにて行った。培地は、培養4日目、7日目および9日目に同じ添加物を含有するものと交換した。培養開始11日目に培地を除き、管腔染色キット（CD31抗体染色用：倉敷紡績（株）KZ-1225）を用いて以下の手順に従い染色した。

【0298】

CD31 (PECAM-1) 染色1次抗体（マウス抗ヒトCD31抗体）をブロッッキング液（1% BSAを含むダルベッコリン酸緩衝液（PBS（-））で4,000倍希釈した。各ウェルにこの1次抗体溶液0.5mlを添加し、60分間37℃でインキュベートした。インキュベート終了後、1mlのブロッッキング液で各ウェルを計3回洗浄した。

【0299】

次いでブロッッキング液で500倍希釈した2次抗体溶液（ヤギ抗マウスIgGアルカリホスファターゼ複合体）0.5mlを各ウェルに添加し、60分間37℃でインキュベートした後、1mlの蒸留水で3回洗浄した。その間に、BCIP/NBTの錠剤2錠を蒸留水20mlに溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで濾過して基質溶液を準備した。調製したBCIP/NBT基質溶液0.5mlを各ウェルに添加し、管腔が深紫色になるまで（通常5～10分間）37℃でインキュベートした。インキュベート終了後、蒸留水1mlで、各ウェルを3回洗浄した後洗浄液を吸引除去し、自然乾燥するため静置した。乾燥後、顕微鏡下で各ウェルを観察した。

【0300】

各ウェルを40倍の顕微鏡で観察し、各ウェルの写真を撮影した。また、1mmのスケールを40倍に拡大した写真を撮影した（図5）。HAECに遺伝子導入をして、その上清を用いたところ、図5のように管腔形成がおこった。p77421は増殖活性のなかった心臓遺伝子ライブラリーの1遺伝子である。

【0301】

得られた各画像を、以下の方法に従い血管新生定量ソフトウェア (KSW-5000U, 倉敷紡績株式会社) を用い定量化した。様々な指標でコンピューター解析をして、このスケールをもとに各視野中に形成された管腔の面積（図6左欄）、長さ（図6右欄）、を測定した。その結果、図6のように形成管腔の面積、長さともp3743が有意に高かった。

【0302】

（配列決定）

配列決定を行ったところ、癌抗原遺伝子として報告のあったSART-2（塩基配列No.1-3958）のC末221個のアミノ酸よりなるポリペプチド断片（SART-2の塩基配列No.2364-3958；配列番号3）であった。このなかで蛋白をコードできる候補は2つあり、それらはSART-2とインフレームであるf1（塩基配列No.2764-3073；配列番号4）、SART-2とはフレームがずれているf2（塩基配列No.2660-2750；配列番号1）であったので、これら遺伝子断片をPCRで増幅してCMV promoterをもつ発現ベクターpCDNA3.1につないだ（図7）。これら遺伝子の細胞増殖能をc-fosプロモーターアッセイで行ったところ、f1は活性がなく、f2はVEGFと同等の活性を有していた（図8）。なおHGFとVEGFのc-fosプロモーターアッセイ活性化能はほぼ同等であった。そこでf2ペプチドについて以下解析を進めた。

【0303】

f2ペプチドを合成し、その様々な量をHAECと接触させ、増殖能をMTSアッセイによって調べた。MTSアッセイとは、MTTアッセイの変法であって、培養中の生細胞によりテトラゾリウム塩（MTS）を発色産物ホルマザンに還元する反応をベースにした生細胞の測定方法である。具体的には、以下のように行う。

- ・HAECを750細胞／ウェルで96ウェルプレートに播種した
- ・100μl／ウェルの内皮細胞用培地（1% FBS、EGF添加なし）にそれぞれのサンプルを2μl／ウェルずつ添加した。毎日（6日目まで）2μl／ウェルを添加した（培地交換はしない）。
- ・1ウェルあたり、測定溶液（Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega社)）を20μl添加し、100μlの内皮細胞用培地と混合し、古い培地を吸引して除いた。測定溶液と細胞の混合溶液を1ウェルあたり120μl入れてCO

- 2 インキュベーターで1～5時間インキュベートした。
・プレートリーダーにて490nmの吸光度を測定した。

【0304】

サンプル群（各8ウェルずつ）は、以下のとおりである。

NC：1% FBSを添加したEBM培地（内皮細胞用培地）のみ。他のサンプルは、この血清添加した培地に、各種ペプチドを添加した。

VEGF-A：組換えVEGF-A（KURABO社）を、終濃度が10ng/mlになるように添加した。

F2-1：F2ペプチドを、終濃度が1ng/mlになるように添加した。

F2-10：F2ペプチドを、終濃度が10ng/mlになるように添加した。

F2-100：F2ペプチドを、終濃度が100ng/mlになるように添加した。

F2-1000：F2ペプチドを、終濃度が1000ng/mlになるように添加した。

その結果、図9に示すように、VEGF蛋白と同様に、用量依存的に、F2ペプチドの細胞増殖能を認めた。F2ペプチドのアミノ酸配列は、MLSLIFLHRLKSMRKRLDRKLRFWHRKNYP（配列番号2）の30アミノ酸であり、正に荷電したヘリックスペプチドであり、天然には存在しない人工的活性ペプチドであることが明らかになった。このペプチドは、その構造自体も、さらにその活性の報告も全くない新規物質である。

【0305】

（実施例4：単離したポリペプチド、ポリヌクレオチドを用いる疾患の処置）

本願発明の組成物を用いて、被検体における血管新生を促進することができる。
を処置

実施例2に従って、HVJエンベロープベクターにF2ペプチド発現ベクターを封入する。SDラット（400～500g；日本チャールズリバー社）に対しペントバルビタール・ナトリウム塩（0.1ml/100mg）を腹腔内投与して麻酔し、保温して自動呼吸器により呼吸を確保する。ラットに左側開胸術を施し、HVJエンベロープベクター（20μl）を30Gの注射針を用いて、心尖に直接、慎重に注入する。

【0306】

（試験例1：HVJエンベロープベクター感作ラット冠動脈内皮細胞のF2ペプチドの発現）

HVJエンベロープベクター（ベクター中のF2ペプチド発現ベクター濃度：10μg/ml）を、ラット冠動脈内皮細胞（細胞数：10⁸個）に感作し、F2ペプチドの産生量をELISA法で測定する。また、対照として、F2ペプチド発現ベクターを含まないエンベロープベクターを用いて、上記と同様な試験を行う。更に、非感作ラット冠動脈内皮細胞についてもF2ペプチド産生量を測定する（無処置群）。HVJエンベロープベクターを感作したラット冠動脈内皮細胞は高いレベルでF2ペプチドを産生し、分泌することを確認する。

【0307】

（試験例2：内皮細胞の増殖に対するF2ペプチド発現ベクターの効果）

ヒト内皮細胞にHVJエンベロープベクターを感作し、外因的に添加したヒトF2ペプチドの存在下（1、10及び100ng/ml）又は非存在下に培養し、細胞数の増加率（%）を測定する。外因的に添加したF2ペプチドにより内皮細胞の増殖は促進されることを確認する。一方、HVJエンベロープベクター（濃度：10μg/ml）を感作した内皮細胞を培養し、細胞数の増加を測定し、増加率（%）を求める。HVJエンベロープベクターを感作した内皮細胞の増加率が対照（発現ベクターを含まないHVJエンベロープベクター）に比べて著しく高いことを確認する。更に、上記のHVJエンベロープベクターを感作した内皮細胞の培養をウサギ抗ヒトF2ペプチド抗体の存在下又は非存在下に行ない、細胞数の増加を測定し、増加率（%）を求める。

【0308】

（試験例3：HVJーリポソーム-DNAを直接注入したラット心筋における新生血管増生）
F2ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターを直接注入したラット心筋、ペプチド発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを直接注入したラット心

筋及び無処置のラット心筋をHE染色、Azan染色し、検鏡して微小血管数を数える。F 2 ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターを注入したラット心筋では、ペプチド発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを注入したラット心筋及び無処置のラット心筋と比較して、有意に微小血管数が増加することを確認する。

【0309】

(試験例4：HVJエンベロープベクターを関節内に直接導入することによる関節軟骨の修復)

10週齢のフィッシャーラットの大腿骨顆間部に直径1.8mmのキルシュナー鋼線を用い軟骨下骨を貫く損傷を作製する。術後1週の時点で、実施例2のHVJエンベロープベクター(100 μ l/膝)を直接的に関節内へ導入する。コントロールとして、発現プラスミドを含まないHVJエンベロープベクターを同量関節内に投与する。これらの遺伝子等の導入後1、3、4週でラットを屠殺し、組織学的に修復部位を観察する。F 2 ペプチド発現プラスミドを含むHVJエンベロープベクターの関節内への投与後3週で修復組織の一部にトルイジンブルー染色にて染色されるプロテオグリカンの合成を認める軟骨様細胞の出現を確認する。

【0310】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0311】

血管新生活性を有する新規のペプチド、およびそのペプチドをコードする遺伝子を単離することによって、閉塞性動脈硬化症、バージャー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置、予防、および予後のための新規の薬学的組成物が提供される

【図面の簡単な説明】

【0312】

【図1】 図1は、本発明の核酸の単離のスキームである。

【図2】 図2は、本発明において単離された核酸のc-fosプロモーターアッセイの結果を示す図である。

【図3】 図3は、本発明において単離されたクローンp3743の、c-fosプロモーターアッセイおよびVEGFプロモーターアッセイの結果である。

【図4】 図4は、ヒト大動脈内皮細胞およびヒト大動脈平滑筋細胞におけるMTSアッセイの結果である。

【図5】 図5は、血管新生実験の結果を示す図である。

【図6】 図6は、血管新生定量ソフトによる画像解析を示す図である。

【図7】 図7は、本発明の候補配列を模式的に示した図である。

【図8】 図8は、p3743-f1およびp3743-f2のc-fosプロモーターアッセイを示す結果である。

【図9】 図9は、細胞の生存に対するf 2 ペプチドの影響 (MTSアッセイ)を示す結果である。

【配列表フリーテキスト】

【0313】

配列番号1：血管新生活性を有する新規ペプチドf 2をコードする核酸配列

配列番号2：血管新生活性を有する新規ペプチドf 2のアミノ酸配列

配列番号3：プラスミドp 3 7 4 3のインサート配列

配列番号 4 : 血管新生活性を有する新規ペプチド f 1 をコードする核酸配列

配列番号 5 : 血管新生活性を有する新規ペプチド f 1 のアミノ酸配列

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> GENOMIDEA INC.

<120> BLOOD VESSEL ENDOTHELIAL CELL GROWTH FACTOR GENE

<130> J1-04788047

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(93)

<400> 1

atg	ctg	tcc	ctg	ata	ttt	ttg	cac	aga	ttg	aag	tca	atg	aga	aaa	aga	48
Met	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Ser	Met	Arg	Lys	Arg	
1				5					10					15		

tta	gac	aga	aag	ctc	aga	ttt	tgg	cac	aga	aag	aac	tac	cca	tag	93
Leu	Asp	Arg	Lys	Leu	Arg	Phe	Trp	His	Arg	Lys	Asn	Tyr	Pro		
			20					25					30		

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Ser	Met	Arg	Lys	Arg
1				5					10					15	

Leu	Asp	Arg	Lys	Leu	Arg	Phe	Trp	His	Arg	Lys	Asn	Tyr	Pro
			20					25					30

<210> 3

<211> 1663

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gctgctattg tggaaacagaa cttgcagcat tttaaaccag tgttttcagct gctggagaag 60
cagatactgt cccgagtcgg gaacacagct agcttttagga agactgctga acgcctgctg 120
agatttttcag ataagagaca gactgaggag gccattgaca ggattttttgc catatcacag 180
caacagcagc agcaaagcaa gtcaaagaaa aaccgaaggg caggcaaacg ctataaattt 240
gtggatgctg tccctgatat ttttgcacag attgaagtca atgagaaaaa gattagacag 300
aaagctcaga ttttggcaca gaaagaacta cccatagatg aagatgaaga aatgaaagac 360
cttttagatt ttgcagatgt aacatacggg aaacataaaa atggggggctt gattaaaggc 420
cggtttggac aggcacggat ggtgacaact acacacagca gggcccccac actgtctgct 480
tcctatacca ggttgttcct gattctgaac attgctattt tctttgtcat gttggcaatg 540
caactgactt atttccagag ggcccagagc ctacatggcc aaagatgtct ttatgcagtt 600
cttctcatag atagctgtat tttattatgg ttgtactctt cttgttccca atcacagtgt 660
tagcactgaa gctataaatt acctgggtcat tttgtgatca caagagtcta tgcaaaaaaa 720
aaaattttctt taccccagat tatcagattt ttttccctca gattcatttt aacaaaattaa 780
gggaagatat tttagacaca gaaagcagga acgtggagaa attggagcag gaaaagaaat 840
tatcaaagca atagaaatag cttgggtggtc ctatgggtgt tttggaagta tttggcattg 900
ctaattgagc agtccatata gtactacttt tagaagaaac aaaaagtcctg ttttttaaag 960
taatgttttt tcttatgaga aaaaggttta gatagaattg ggttttatta atattaattt 1020
aatgctatta gcaattttcca tatactatat tgttgaaaag actgaagaat acaattctga 1080
gaaatataaa aaaatttttaa tgggtatactc atgttgaaaag ataaatgttg ctaagtcctg 1140
gtatgatggg gtgagcttcc ttgggggaagt acttcttgag ttatgtaact aacaggatgt 1200
tttactacag atctggatgg ctattcagat aacatggcaa aaaaatgatag cagaagatca 1260
ttaaaaactt aaaatatatt ttattagaaa acatttatct atgaatgaat atttccttga 1320
tgctgggtctc tgcacacata tgcttgggtta cttgcatgca ttcattgggt gttcaataag 1380

tgagatgatt acagataact taatactgta ttttccttat atggaaaacc gttatagacc	1440
caataacaac taaacctttc aaaagaaaat attttctatt atgaatgttg attttcatac	1500
caaagaagat ggagagtcta aaattttggat atgattctta tgttttttta atagaaaacc	1560
ttctttcaagt ttatttttcct aaataaacat cataattgtg aattttaaaaa aaaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaa	1663

<210> 4
 <211> 312
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(312)

atg aaa gac ctt tta gat ttt gca gat gta aca tac gag aaa cat aaa	48
Met Lys Asp Leu Leu Asp Phe Ala Asp Val Thr Tyr Glu Lys His Lys	
1 5 10 15	
aat ggg ggc ttg att aaa ggc cgg ttt gga cag gca cgg atg gtg aca	96
Asn Gly Gly Leu Ile Lys Gly Arg Phe Gly Gln Ala Arg Met Val Thr	
20 25 30	
act aca cac agc agg gcc cca tca ctg tct gct tcc tat acc agg ttg	144
Thr Thr His Ser Arg Ala Pro Ser Leu Ser Ala Ser Tyr Thr Arg Leu	
35 40 45	
ttc ctg att ctg aac att gct att ttc ttt gtc atg ttg gca atg caa	192
Phe Leu Ile Leu Asn Ile Ala Ile Phe Phe Val Met Leu Ala Met Gln	
50 55 60	
ctg act tat ttc cag agg gcc cag agc cta cat ggc caa aga tgt ctt	240
Leu Thr Tyr Phe Gln Arg Ala Gln Ser Leu His Gly Gln Arg Cys Leu	
65 70 75 80	
tat gca gtt ctt ctc ata gat agc tgt att tta tta tgg ttg tac tct	288
Tyr Ala Val Leu Leu Ile Asp Ser Cys Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Ser	
85 90 95	
tct tgt tcc caa tca cag tgt tag	312
Ser Cys Ser Gln Ser Gln Cys	
100	

<210> 5
<211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Asp Leu Leu Asp Phe Ala Asp Val Thr Tyr Glu Lys His Lys
1 5 10 15

Asn Gly Gly Leu Ile Lys Gly Arg Phe Gly Gln Ala Arg Met Val Thr
20 25 30

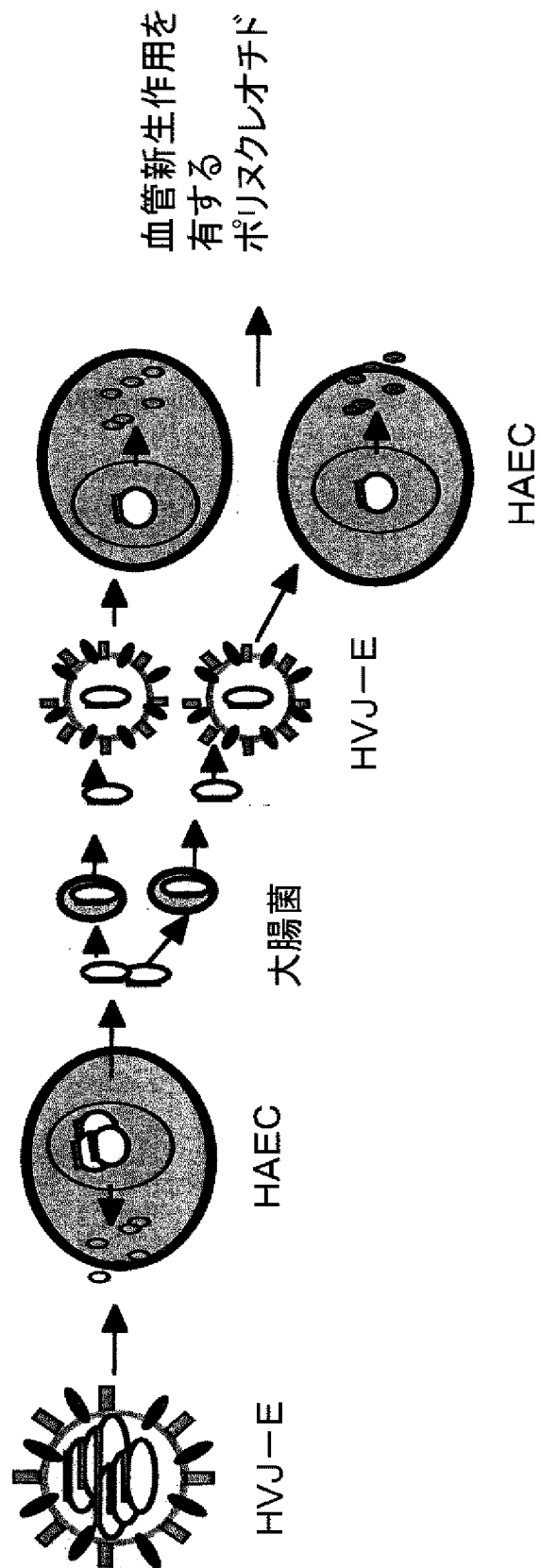
Thr Thr His Ser Arg Ala Pro Ser Leu Ser Ala Ser Tyr Thr Arg Leu
35 40 45

Phe Leu Ile Leu Asn Ile Ala Ile Phe Phe Val Met Leu Ala Met Gln
50 55 60

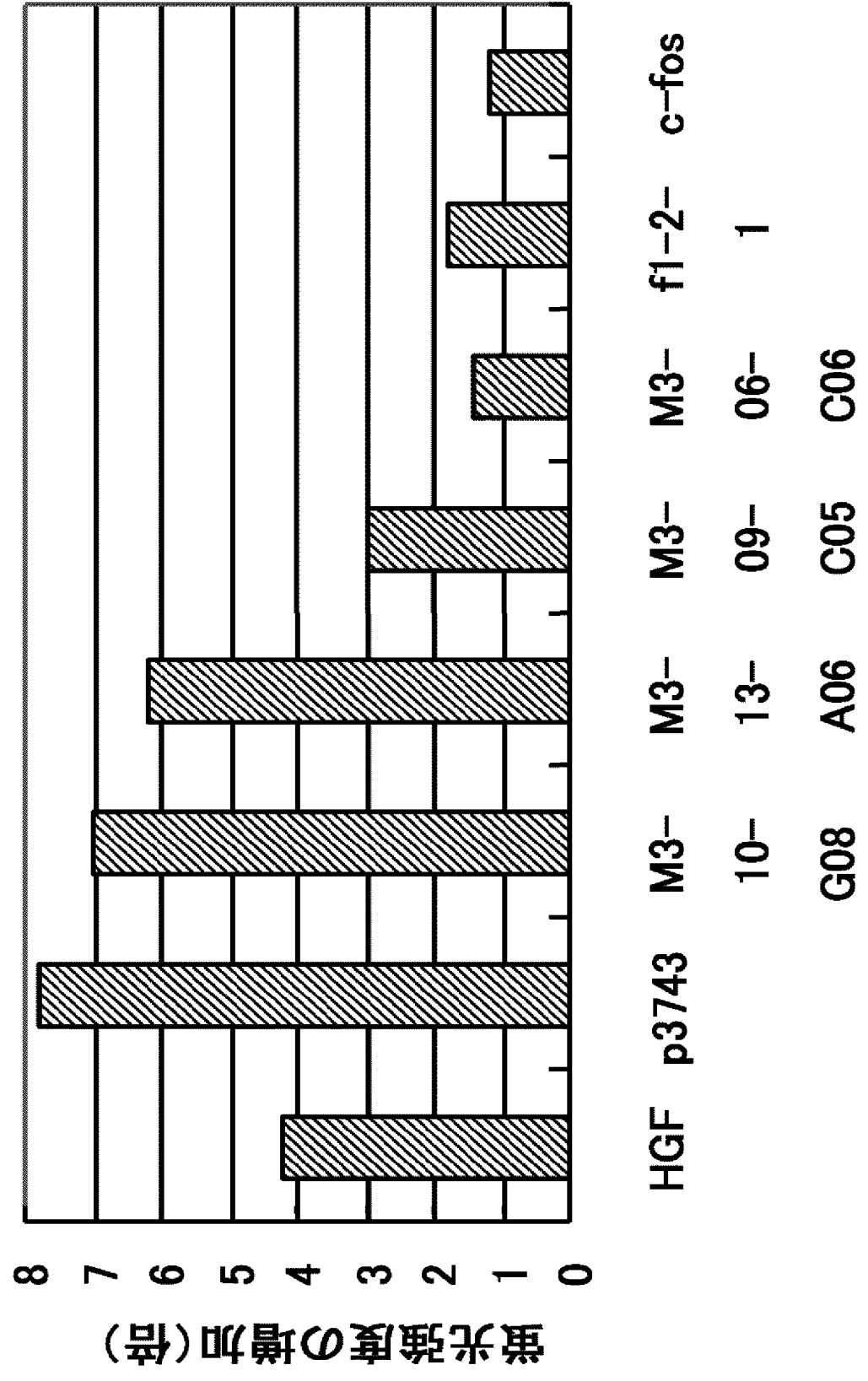
Leu Thr Tyr Phe Gln Arg Ala Gln Ser Leu His Gly Gln Arg Cys Leu
65 70 75 80

Tyr Ala Val Leu Leu Ile Asp Ser Cys Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Ser
85 90 95

Ser Cys Ser Gln Ser Gln Cys
100

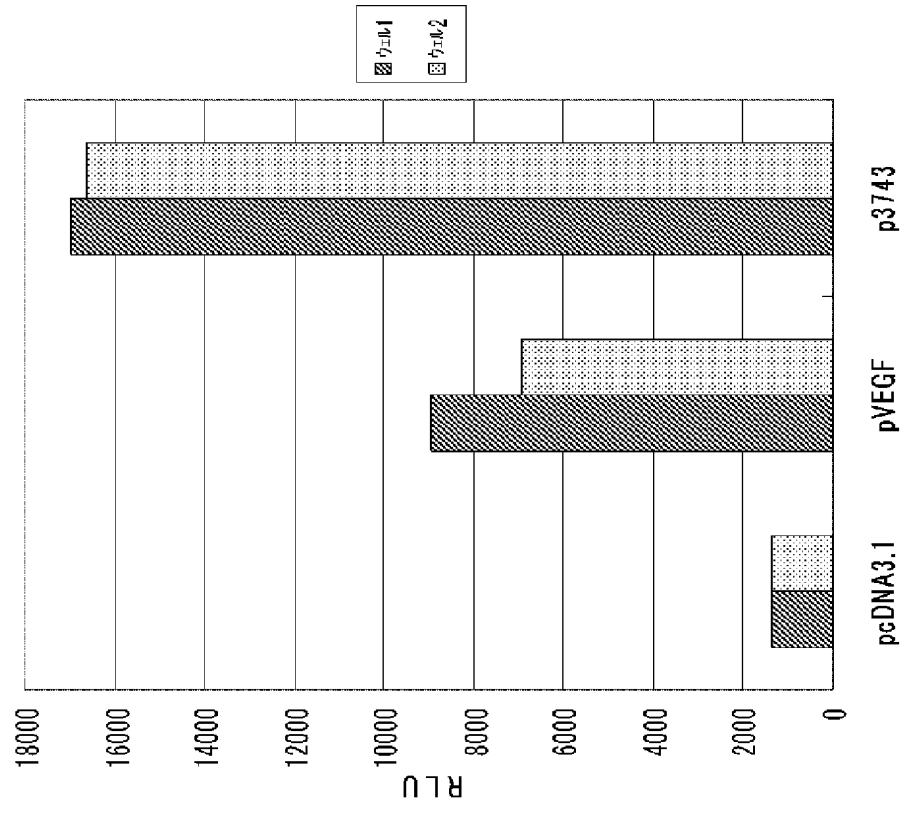


c-fos プロモーターアッセイ

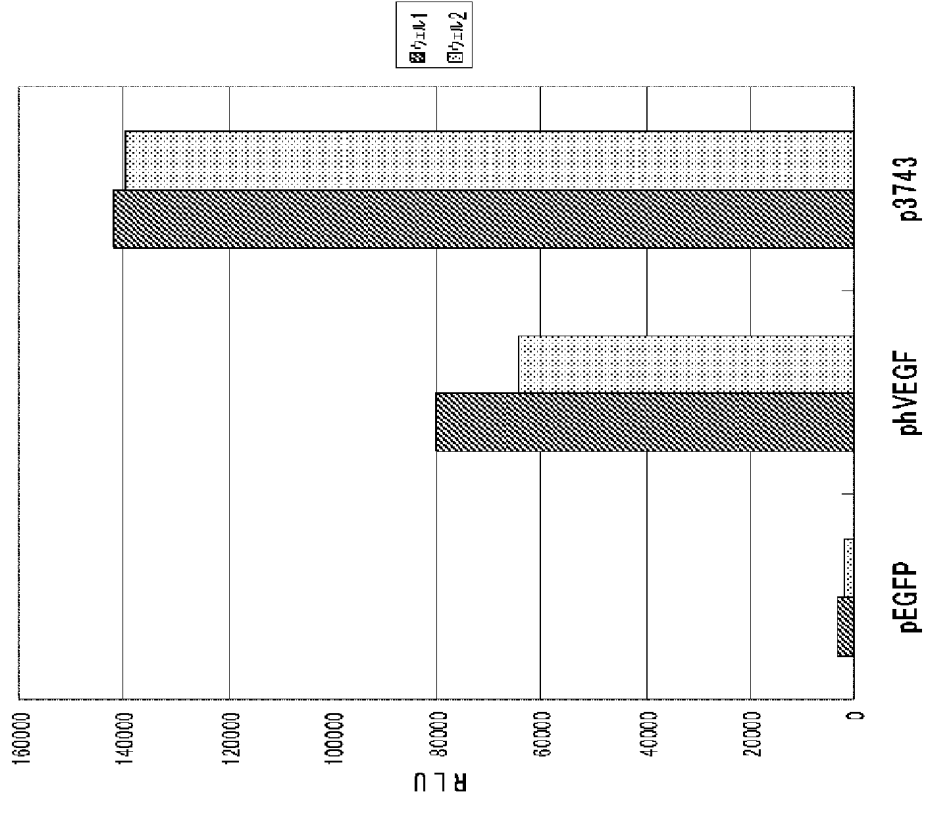


p3743のc-fosおよびVEGFプロモーターアッセイ

c-fos ルシフェラーゼアッセイ

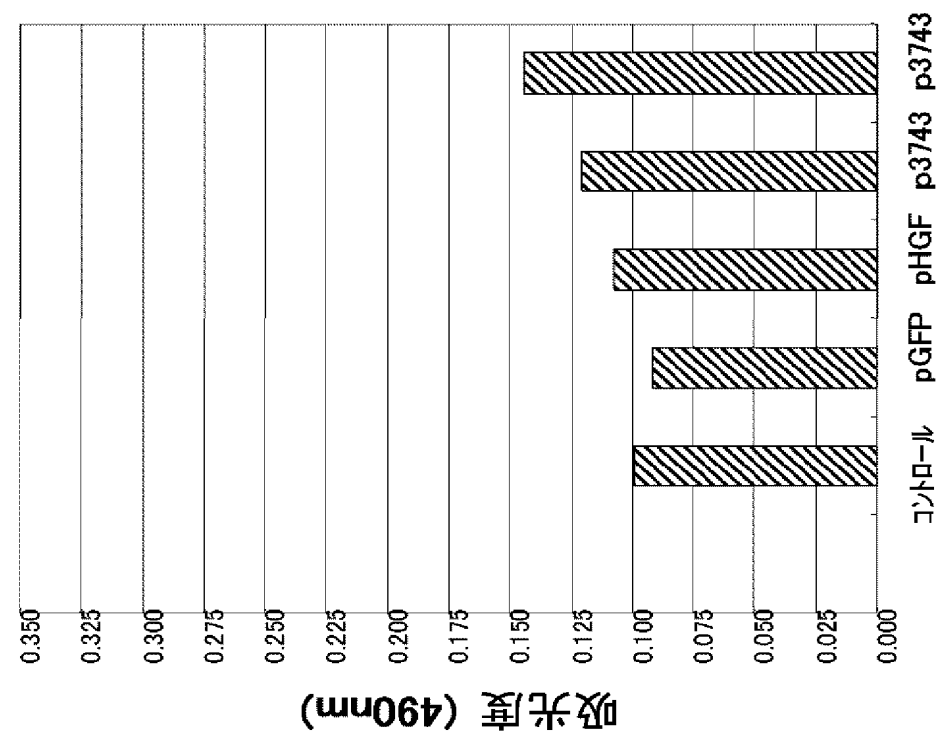


VEGF プロモーターアッセイ

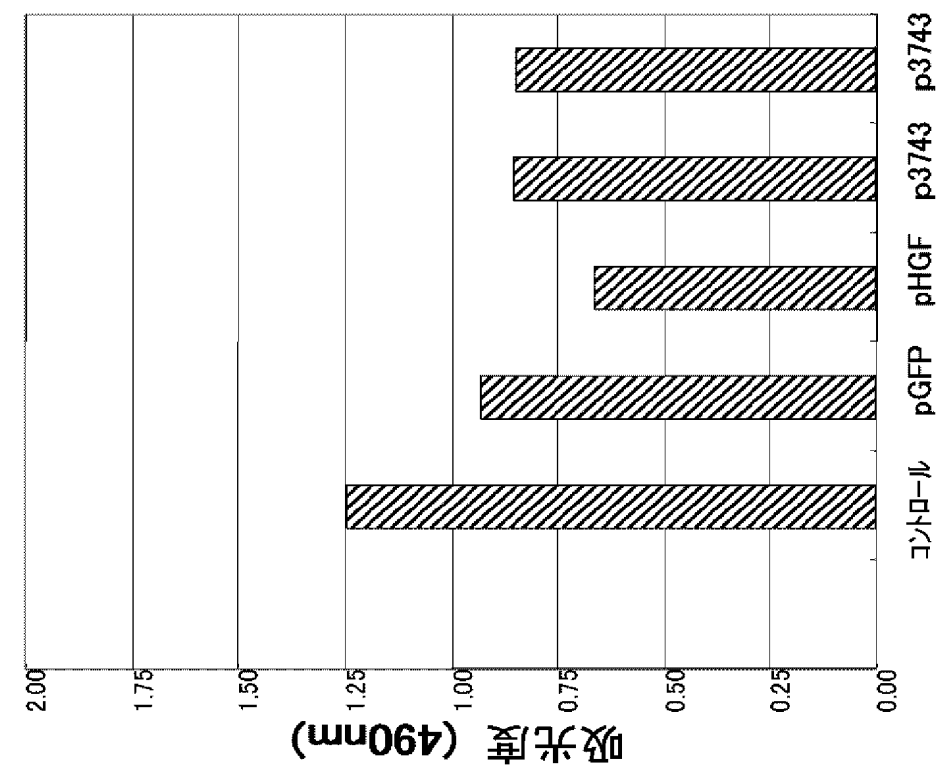


ヒト大動脈内皮細胞およびヒト大動脈平滑筋細胞 におけるMTSアッセイ

ヒト大動脈内皮細胞



ヒト大動脈平滑筋細胞

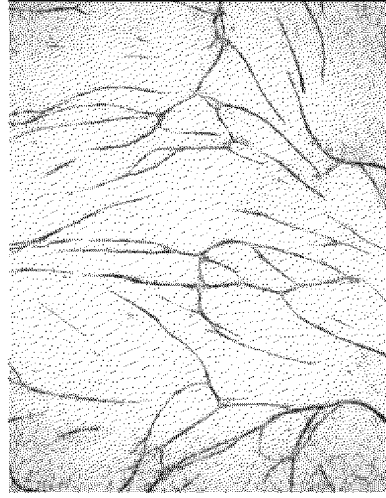


血管新生活性の測定

【図 5】



ブランク



VEGF-A



pVEGF



pSPORT1



p3743

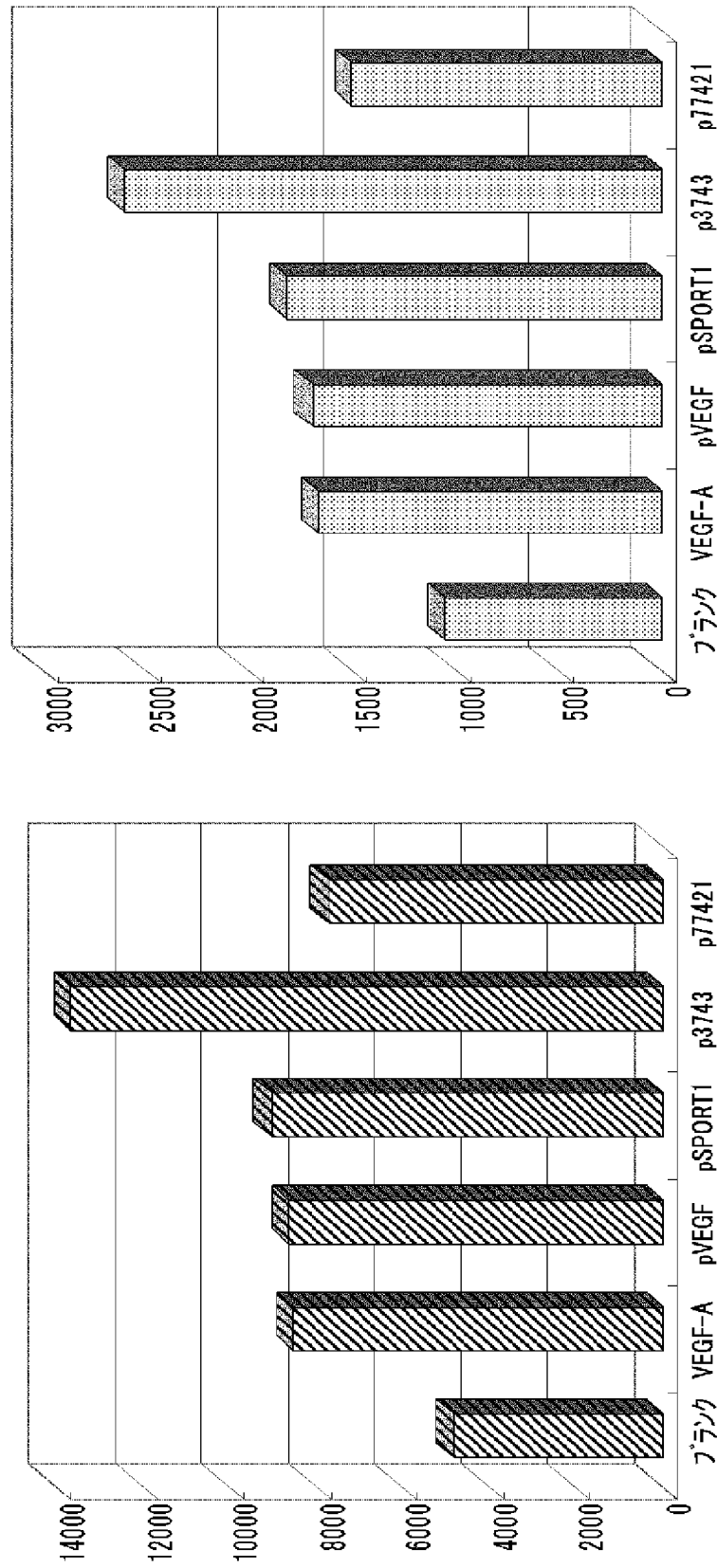


p77421

血管新生定量ソフトによる画像解析

面積

長さ



候補配列の単離

3958

1



3958

2364

p3743



候補ペプチド

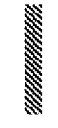
2764 3073



f1

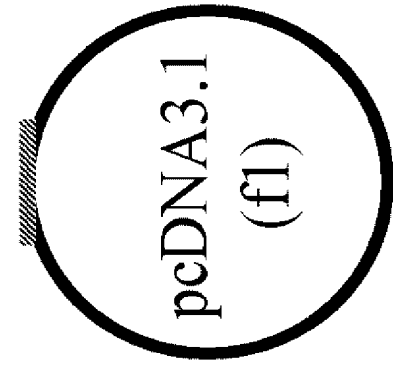
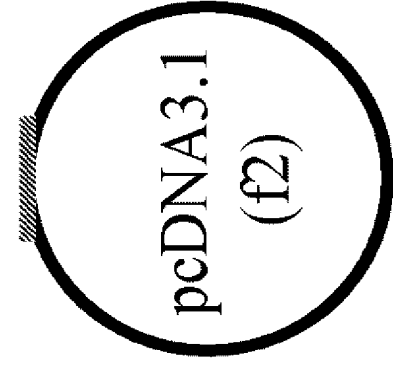
(約300bp)

2660 2750



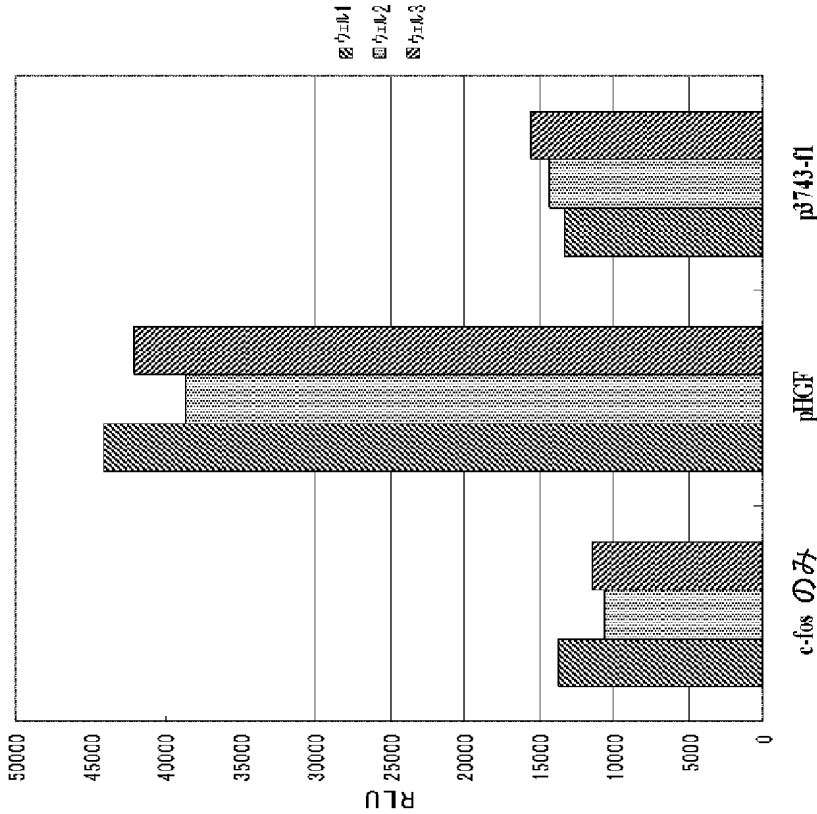
f2

(約100bp)

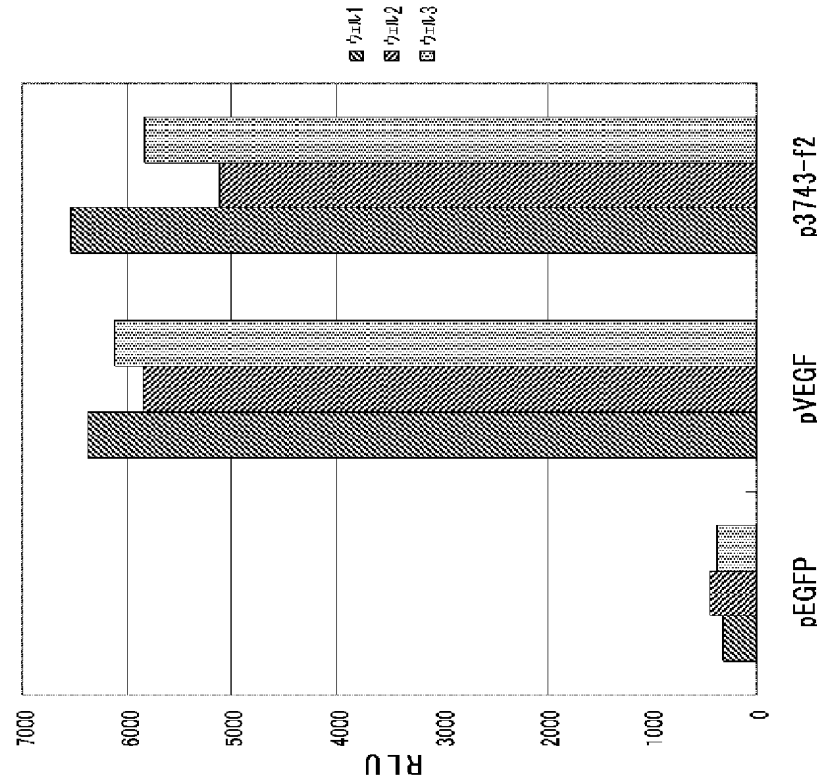


p3743-f1 およびp3743-f2のc-fosプロモーターアッセイ

p3743-f1のc-fosプロモーターアッセイ

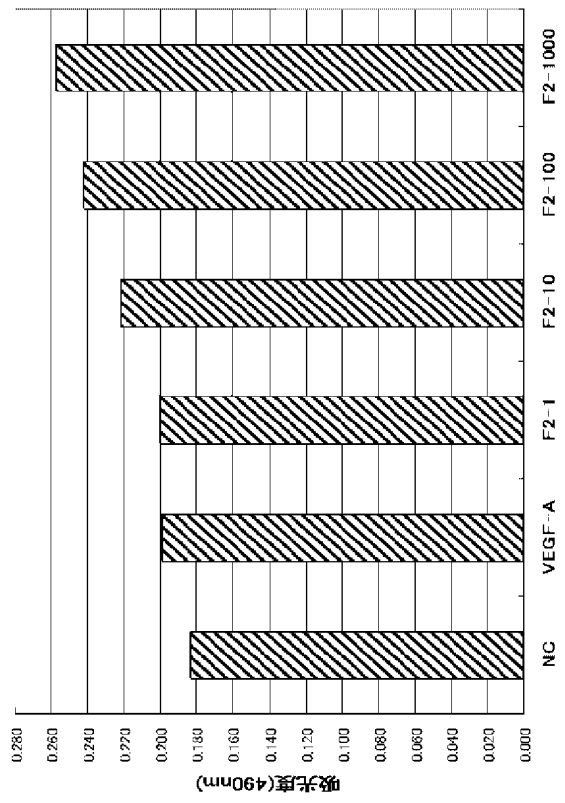


p3743-f2のc-fosプロモーターアッセイ

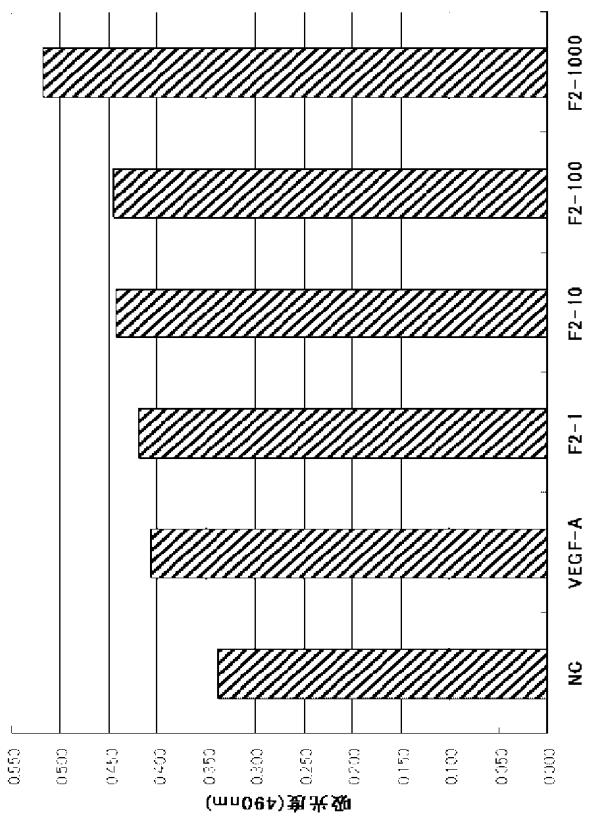


ポリペプチドによるヒト大動脈血管内皮細胞増殖能 (MTS アッセイ)

F2ペプチドを用いる HAEC 増殖アッセイ
1日目



F2ペプチドを用いる HAEC 増殖アッセイ
4日目



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、血管内皮細胞増殖活性、c-fosプロモーターからの転写促進活性、VEGFプロモーターからの転写促進活性、および／または血管新生活性を有する新規のポリペプチド、およびそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明は、これらポリペプチドおよび／またはポリペプチドを含む、閉塞性動脈硬化症、バジュー病、末梢血管病、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、虚血性心疾患、および虚血性脳疾患からなる群から選択される疾患の処置のための薬学的組成物、ならびにこれら疾患の処置方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 上記活性を有する新規ペプチド、およびそのペプチドをコードするヌクレオチドを単離することによって、上記課題が解決した。

【選択図】 なし

出願人履歴

3 0 2 0 6 0 2 8 1

20021018

新規登録

大阪府大阪市北区天満四丁目 1 5 番 5 号

ジェノミディア株式会社

3 0 2 0 6 0 2 8 1

20040916

住所変更

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号

ジェノミディア株式会社